

**Philipps**



**Universität  
Marburg**

**Die Rolle der SPA-Proteine  
auf den lichtregulierten  
Abbau von *Arabidopsis thaliana*  
Cryptochrom 2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Guido Benjamin Weidler**

geboren in Marburg

Marburg / Lahn 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Mai 2007 bis Januar 2011 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am: 07.04.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Galland

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Photorezeptoren und Lichtperzeption in Höheren Pflanzen</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rotlichtperzeption: Die Phytochrome</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Blaulichtperzeption: Die UV-A/Blaulichtphotorezeptoren</b>	<b>8</b>
1.3.1 Phototropine	8
1.3.2 Zeitlupen Familie	9
1.3.3 Cryptochrom/Photolyase-Familie	11
1.3.3.1 Evolution der Cryptochrome /Photolyase-Familie	12
1.3.3.2 Photolyasen und AtCRY3 (CRYDASH)	13
1.3.3.3 Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
Entdeckung und Verbreitung	15
Domänen und Struktur	15
Expression und Lokalisation	17
Signaltransduktion: Elektronentransfer, Phosphorylierung und Dimerisierung	18
Signalweiterleitung und Biologische Funktion	21
<b>1.4 Repression der Photomorphogenese</b>	<b>24</b>
1.4.1 COP1: ein Repressor der Photomorphogenese	24
1.4.2 SPA Protein Familie	27
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>3. Material &amp; Methoden</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Materialien</b>	<b>32</b>
3.1.1 Chemikalien	32
3.1.2 Geräte	32
3.1.3 Antikörper	34
3.1.4 Oligonukleotide	34
3.1.5 Plasmide	35
3.1.6 <i>Escherichia coli</i> Stämme	36
<b>3.2 Methoden</b>	<b>37</b>
3.2.1 Organismen Anzucht und Kultivierung	37
3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	37
3.2.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Anzucht auf Platte	39
Anzucht auf Erde	39

Lichtbedingungen und Bestrahlungsversuche	40
3.2.1.3 Insektenzelllinie IPLB-Sf21 (Sf21) von <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
Insekten-Zelllinie Sf21	40
Anzucht und Kultivierung von Sf21 Zellen	41
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.2.1 Herstellung kompetenter E.coli Zellen	41
Calciumchlorid-Methode	41
RF1 RF2-Methode	42
3.2.2.2 Transfektionsmethoden	42
Transformation von Escherichia coli	42
Co-Transfektion von Sf21 Zellen	43
3.2.2.3 Isolation von Nukleinsäuren aus E.coli	43
Plasmidpräparation durch Alkalische Lyse	43
Midi- und Maxipräparation von Plasmid DNA	44
3.2.2.4 Aufreinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	45
Phenol-Chloroform-Extraktion	45
Isopropanol Fällung	45
QIAquick PCR Purification Kit	45
3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid DNA	46
3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung	47
3.2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten	47
Polymerasekettenreaktion PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )	47
Reinigung und Extraktion von Nukleinsäuren bzw. Plasmid DNA	49
Restriktion von DNA	49
Generierung von Adenosin Überhängen	50
Ligation	50
Sequenzanalyse von DNA-Fragmente	51
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden	51
3.2.3.1 in-silico Analysen	51
3.2.3.2 Proteinexpression	52
in <i>Escherichia coli</i>	52
Sf21 Baculovirus Expressionssystem	53
<i>in vitro</i> Translation und Transkription (TNT)	53
3.2.3.3 Proteinextraktionen	54
aus <i>Escherichia coli</i>	54
aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	55

aus <i>Sf21-Insektenzellen</i>	55
3.2.3.4 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen mit Amidoschwarz	56
3.2.3.5 Denaturierende SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	57
Färbung von SDS-Page Gelen mit Coomassie	58
3.2.3.6 Western Transfer auf PVDF und NCP Membranen	58
3.2.3.7 Immunologische Nachweise von Proteinen	59
Nachweis mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL)	60
Nachweis mittels Farbreaktion (Alkalische Phosphatase)	61
Nachweis mittels Fluoreszenz markierten Antikörpern (LICOR Odyssey)	61
Strippen der Membran	62
Farbnachweis mittels Ponceau Red	62
3.2.3.8 Nachweis radioaktiv markierter Proteine	62
3.2.3.9 Proteinreinigungen	63
Aufreinigung von Proteinen über Affinitätschromatographie	63
Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit dem Batch-Verfahren	64
Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit dem ÄKTA Purifier	66
Entsalzung und Ankonzentrierung von Proteinlösungen	67
Größenausschlusschromatographie	67
3.2.3.10 Nachweis von Protein-Protein-Interaktion mittels CO-Immunopräzipitation (IP)	68
3.2.3.11 Dephosphorylierung durch Behandlung mit Lambda Protein Phosphatase ( $\lambda$ -PP Phosphatase)	69
3.2.3.12 Proteasom Inhibition	69
3.2.3.13 Quantifizierung der CRY2 Proteinmenge mit Hilfe der Li-COR Software	70
<b>4. Ergebnisse</b>	71
<b>4.1 Expression von Proteinen</b>	71
4.1.1 Expression und Aufreinigung von COP1-Konstrukten	71
4.1.2 Expression und Aufreinigung von CRY2-Konstrukten aus <i>E. coli</i>	76
4.1.3 Expression und Aufreinigung von His-Cry2 aus Sf21 Insektenzellen	79
4.1.4 Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von rekombinantem His-CRY2 mit verschiedenen radioaktiv markierten möglichen Interaktionspartnern	80

<b>4.2 Blaulichtabhängige Degradation von CRY2 in <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	85
4.2.1 Einfluss von SPA Proteinen auf die Kinetik des CRY2 Abbaus	85
4.2.2 Fluenzratenabhängiger Abbau von CRY2 im Blaulicht	87
4.2.3 Bestimmung des Zusammenhangs von Signalstärke und Proteinmenge bei Verwendung des LI-COR Odyssey Systems	93
4.2.4 Einfluss von Rot- und Dunkelrotbestrahlung auf die Stabilität von CRY2	94
4.2.5 Vergleich des CRY2-Proteinlevels in verschiedenen Ökotypen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	95
4.2.6 Einfluss von Proteasom-Inhibitoren auf den Abbau von CRY2 im Blaulicht	96
4.2.7 Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums bei verschiedenen Lichtqualitäten	98
4.2.8 CRY2 Proteinmenge unter Lang- und Kurztag-Bedingungen	99
4.2.9 Blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums bei verschiedenen Fluenzraten von Blaulicht	102
4.2.10 Untersuchung über den Phosphorylierungszustand von CRY2 nach Blaulichtbestrahlung	104
<b>5. Diskussion</b>	107
5.1 Blaulicht abhängige Degradation von Cryptochrom 2	107
5.2 Cryptochrom 2 interagiert mit SPA1 und SPA4 <i>in vitro</i>	116
5.3 Blaulicht abhängige Phosphorylierung von Cryptochrom 2	119
5.4 Versuch der Expression von rekombinantem COP1 und dem C-Terminus von Cryptochrom 2 in <i>E.coli</i>	122
<b>6. Zusammenfassung</b>	125
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	128
<b>8. Anhang</b>	142

# Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Abb.	Abbildung	IgG	Immunglobulin G
AK	Antikörper	IPTG	Isopropyl-β-D- Thiogalactopyranosid
Amp	Ampicillin	Km	Kanamycin
AP	Alkalische Phosphatase	kb	Kilobasen
AP20187	Rapamycin Analoga	kDa	Kilodalton
APS	Ammonium Persulfat	L	Liter
Aqua. bidest.	Bidestilliertes Wasser	LB	Nährmedium nach Luria Bertani
AS	Aminosäure	LED	<i>Light emitting Diode</i>
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LFR	<i>low fluence response</i>
ATP	Adenosintriphosphat	LIAC	<i>light induced absorbance change</i>
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3- indolyphosphat	LOV	<i>light oxygene voltage</i>
bp	Basenpaar	M	mol/L
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovin serum albumin</i>	MCS	<i>Multiple Cloning site</i>
CCT	C-Terminus von Cryptochromen	min	Minute
cm	Zentimeter	mM	millimolar
Cam	Chloramphenicol	MTHF	N5N10-Methenyl-5,6,7,8- tetrahydrofolat
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer	NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
COP1	<i>constitutive photomorphogenic</i>	nm	Nanometer
CRY	Cryptochrom	NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	OD	Optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ø	Durchmesser
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PAS	PER, ARNT, SIM
DTT	Dithiothreitol	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PEG	Polyethylenglykol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>	PHOT	Phototropin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PHY	Phytochrom
EST	<i>expressed sequence tag</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
et al.	Et alii, und andere	PVDF	Polyvinylidendifluorid
FAD	Flavinadenindinukleotid	rpm	Umdrehungen/Minute, <i>revolutions per minute</i>
FMN	Flavinmononukleotid	RT	Raumtemperatur
FKBP	FK506 binde-Protein	s	Sekunde
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfat</i>
g	Gramm	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
GUS	β-Glucuronidase		
h	Stunde		
HIR	Hochintensitätsreaktion		

TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered-saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N',- Tetramethyldiamin
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)- aminoethanhydrochlorid
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VLFR	<i>very low fluence response</i>
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
$\alpha$	Antikörper
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	micro



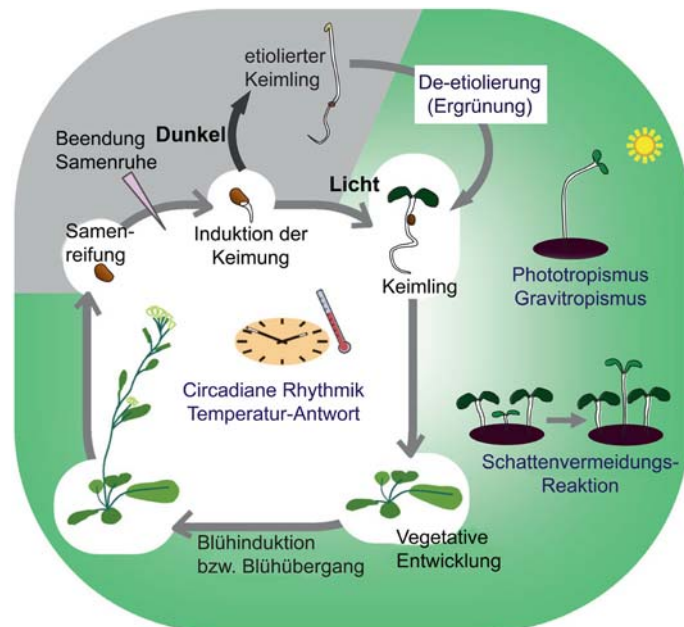
# 1. Einleitung

## 1.1 Photorezeptoren und Lichtperzeption in Höheren Pflanzen

Pflanzen nutzen aufgrund ihrer photoautotrophen und sessilen Lebensweise Sonnenlicht nicht nur als Energiequelle, indem Sie über den Prozess der Photosynthese Sonnenenergie in chemische Energie umwandeln, sondern haben durch die Entwicklung eines komplexen photosensorischen Systems die Fähigkeit entwickelt, die sie umgebenden Lichtverhältnisse als Informationsquelle zu nutzen, um hierdurch eine Vielzahl verschiedener physiologischer Antworten in ihrem gesamten Lebenszyklus zu kontrollieren (Abb.1.1). Diese unterschiedlichen Reaktionen bzw. Antworten auf die verschiedensten Lichtqualitäten und –

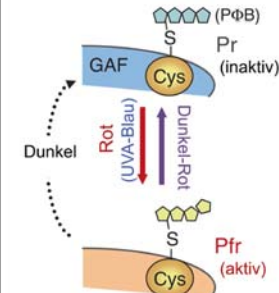
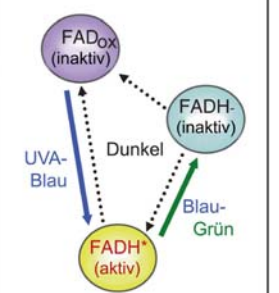
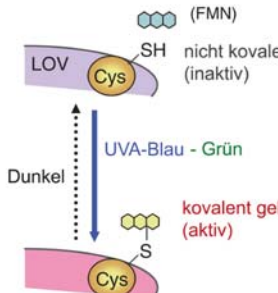
quantitäten werden im Allgemeinen auch mit dem Begriff ‚Photomorphogenese‘, der Entwicklung im Licht, zusammengefasst (Kendrick und Kronenberg, 1994). So sind die Entwicklungsprozesse ausgehend von der Samenkeimung, über die Entwicklung des Keimlings und der adulten Pflanze, bis hin zur Umstellung von vegetativem zu reproduktivem Wachstum allesamt von sensorischen Photorezeptoren reguliert bzw. abhängig von diesen (Briggs und Spudich, 2005). Da sich die Lichtbedingungen in

Qualität (spektrale Zusammensetzung), Quantität (Intensität), Richtung und Dauer (in Abhängigkeit von der Jahreszeit und dem Breitengrad) und Standort (wetterabhängig; Position innerhalb einer Pflanzengemeinschaft) jeweils unterscheiden, müssen Pflanzen in der Lage sein, diese im Einzelnen wahrzunehmen. Dazu bedienen sie sich einer Vielzahl verschiedener Photorezeptoren (Abb.1.2), die aufgrund ihrer Absorptions-Eigenschaften bzw. ihres Spektralverhaltens in verschiedene Klassen unterteilt werden. So wurden in *Arabidopsis thaliana* vier verschiedene auf molekularer Ebene charakterisierte Klassen von Photorezeptoren identifiziert, die auch in allen anderen untersuchten Höheren Pflanzen gefunden wurden, wobei die Anzahl der Mitglieder in den einzelnen Klassen zwischen den



**Abb. 1.1 Übersicht des Einflusses von Licht auf das Wachstum und die Entwicklungsprozesse der Pflanze. Die Photomorphogenese in *Arabidopsis thaliana*.** Abbildung aus Kami *et al.*, (2010).

Species variiert. *Arabidopsis thaliana* besitzt fünf Phytochrome (phyA-phyE) die zu der Klasse der Rotlicht-

	Phytochrome (phy)	Cryptochrome (cry)	Phototropine (phot)	Zeitlupe (ZTL)
Genfamilie in <i>Arabidopsis</i>	PHYA, B, C, D, E	CRY 1, 2, 3	PHOT 1, 2	ZTL, FKF1, LKP2
Domänen-Struktur	NT-PAS-GAF-PHY-PAS-PAS-HKRD	PHR-CT	LOV1-LOV2-KD	LOV-F-box-KELCH
Chromophore	Phytochromobilin (PΦB)	Flavinadenindinukleotid (FAD), vollständig oxidiertes FAD <sub>ox</sub> , semireduziertes neutrales FADH <sup>•</sup> , vollständig reduziertes FADH <sup>-</sup> , Pterin	Flavinmononukleotid (FMN)	FMN (nicht bestätigt)
Photoreversibilität				

**Abb. 1.2 Übersicht über die verschiedenen pflanzlichen Photorezeptoren, ihre jeweilige Chromophoren und deren primäre Lichtreaktion.**

*Arabidopsis thaliana* besitzt fünf Phytochrom-kodierende Gene (*PHYA-E*), drei Gene für Cryptochrom (*CRY1-3*), zwei Gene für Phototropine (*PHOT1* und *PHOT2*) sowie drei für die Zeitlupen Familie (*ZTL*, *FKF1*, *LKP2*). Die Organisation der Protein-Domänen dieser Photorezeptoren ist schematisch dargestellt und die Pfeilenden geben die Position der einzelnen Chromophor-Bindungsstellen an. Phytochrome besitzen eine N-terminale Extension (NT) gefolgt von einer PAS Domäne, einer GAF (cGMP Phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA) Domäne an die der Chromophor bindet, einer PHY Domäne und einem C-Terminus aus zwei PAS Domänen, gefolgt von einer HKRD (*histidin-kinase related domain*) Domäne. Cryptochrome besitzen eine PHR (*photolyase homology region*) Domäne und eine C-terminale Extension mit einem DAS Motiv. Phototropine besitzen N-terminal zwei LOV Domänen (*light, oxygen, voltage*) und eine Ser-/Thr Protein Kinase Domäne (KD). Mitglieder der Zeitlupe Familie besitzen N-terminal eine LOV Domäne, eine F-Box und eine Wiederholung von Kelch Domänen. Phytochrome besitzen Phytochromobilin (PΦB) als Chromophor, der kovalent an einen Cystein Rest in der GAF Domäne gebunden ist. Die Photoreversibilität in Form der Konformationsänderung von der Pr- in die Pfr-Form und zurück wird durch eine Isomerisierung der Doppelbindung zwischen dem (C) und (D) Ring des Tetrapyrrols erreicht. Cryptochrome haben zwei Chromophore, nämlich FAD (Flavin Adenin Dinucleotid) und ein Pterin (MTHF) das als Antennenpigment fungiert. Der lichtabhängige Wechsel des FAD zu FADH<sup>•</sup> oder zu der neutralen radikalen Form (FADH<sup>•</sup>) ist in der Abbildung dargestellt (Bouly *et al.*, 2007). Phototropine haben FMN (Flavin Mononukleotid) als Chromophor, der im Dunkeln nicht kovalent, nach UV-A/Blau Licht Bestrahlung kovalent an ein Cysteinrest in der LOV Domäne gebunden ist. Zeitlupe Familie Photorezeptoren besitzen ebenfalls eine photosensorische LOV Domäne, doch ist diese im Gegensatz zu den Phototropinen nach Licht Einfall für einen längeren Zeitraum (Stunden) aktiv und kehrt nicht schnell in den inaktiven Dunkelzustand zurück (wie bei den Phototropinen). Abbildung aus Kami *et al.*, (2010).

photorezeptoren gehören und im Rot (666 nm) bzw. Dunkelrot (730 nm) Bereich ihre maximale Absorption besitzen (Franklin und Quail, 2010; Rockwell *et al.*, 2006). Phytochrome haben großen Einfluss auf die Steuerung der Genexpression (Thompson und White, 1991; Hamazato *et al.*, 1997) und auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse wie z.B. der Samenkeimung (Shinomura *et al.*, 1996; Henning *et al.*, 2002) und auf den nachfolgenden Prozess der Deetiolierung.

Die UV-A/Blau Lichtphotorezeptoren bestehen aus drei verschiedenen Klassen: Den Phototropinen, der Zeitlupen (ZTL) Familie und den Cryptochromen welche große Ähnlichkeit zu Photolyasen aufweisen. Diese Photorezeptoren besitzen ihre

Absorptionsmaxima im Bereich von 350 nm bis 500 nm. Die Phototropine (PHOT1 und PHOT2) in *Arabidopsis thaliana* steuern den Phototropismus und andere Bewegungsantworten, wie Ausrichtung von Chloroplasten und Zellkern, oder die Bewegung der Schließzellen, die das Öffnen und Schließen der Stomata regulieren. Die Zeitlupe Familie ist an der Regulierung der Inneren Uhr und somit an der circadianen Rhythmik beteiligt. Die photoperiodische Blütenbildung wird ebenfalls von der Zeitlupe Familie reguliert (Imaizumi *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 2004). Die Cryptochrome mit CRY1, CRY2 in *Arabidopsis thaliana* haben im Zusammenspiel mit Phytochromen einen großen Einfluss auf den De-etiolierungsprozess des Keimlings und im Zusammenspiel mit der ZTL-Proteinfamilie sowie phyA (fördernd) und phyB (hemmend) regulieren sie die Blühinduktion. Zusätzlich besitzen Mitglieder der Cryptochrom/Photolyase Familie, wie CRY3 (oder CRY-DASH) aus *Arabidopsis thaliana*, DNA-Reparatur Aktivität und werden auch als möglicher Magnetfeldrezeptor (Magnetkompass) bei der Orientierung von Zugvögeln diskutiert (Ritz *et al.*, 2000; allgemeiner Überblick: Wiltshko und Wiltshko, 2006).

Photorezeptoren, die für die Absorption von UV-B-Strahlung sowie Grünlicht verantwortlich sind, konnten bisher nicht molekular identifiziert werden. Jedoch sprechen spezifische Grünlichteffekte (Folta und Maruhnich, 2007) und Antworten von Pflanzen auf UV-B (Übersichtsartikel Jenkins, 2009), die nicht auf die Funktion der oben genannten Photorezeptoren zurückzuführen sind, für das Vorhandensein von spezifischen UV-B bzw. Grünlicht- Photorezeptor-Systemen.

Einen genauen Überblick über pflanzliche Photorezeptoren, deren Signalweiterleitung und lichtgesteuerte Prozesse geben folgende Übersichtsartikel und Bücher: Briggs und Olney, 2001; Fankhauser und Staiger, 2002; Quail, 2002; Batschauer (Ed.) Photoreceptors and Light Signalling 2003; Gyula *et al.*, 2003; Sullivan und Deng, 2003; Chen *et al.*, 2004; Franklin *et al.*, 2005; Briggs und Spudich (Eds.) Handbook of Photosensory Receptors, 2005; Whitelam und Halliday (Eds.) Light and Plant Development, 2007.

## 1.2 Rotlichtperzeption: Die Phytochrome

Die Phytochrome gehören zu den best untersuchten Photorezeptoren, da sie zuerst als solche identifiziert wurden. Es wurde früh beobachtet, dass verschiedene Aspekte der pflanzlichen Entwicklung, z.B. die Samenkeimung, die durch Rotlicht (R) stimuliert wird, durch nachfolgende Exposition mit Dunkelrotlicht (DR) inhibiert bzw. revertiert wird (Borthwick *et al.*, 1952). Dieser R/DR Effekt ließ auf einen spezifischen Photorezeptor schließen. Der Nachweis wurde über die Aufreinigung eines Proteins erbracht, das die R/DR Reversibilität im Absorptionsspektrum zeigte (Withrow *et al.*, 1957, Butler *et al.*, 1959). Das erste Phytochrom Gen wurde 1984 in Hafer identifiziert (Hershey *et al.*, 1984) und bis heute

wurde Phytochrom in vielen anderen Blütenpflanzen sowie in Gymnospermen, Farnen, Mosen und Algen (Schneider-Poetsch *et al.*, 1998) entdeckt. In Cyanobakterien und nicht photosynthetischen Bakterien sowie in Pilzen konnten ebenso Gene identifiziert werden, die Phytochrom ähnliche Sequenzen aufweisen (Kehoe und Grossman 1996, Davis *et al.*, 1999, Karniol *et al.*, 2005). In *Arabidopsis thaliana* und Tomate, beispielhaft für höhere Pflanzen, wurden fünf Phytochrome (phyA-E) identifiziert (Sharrock and Quail 1989; Clack *et al.*, 1994). Aufgrund phylogenetischer Analysen und der unterschiedlichen Lichtstabilität werden die Phytochrome in zwei Klassen unterteilt. Phytochrom A gehört zum Typ I Phytochrom, während Typ II die Phytochrome B-E umfasst, wobei aufgrund der Ähnlichkeit auf Proteinebene phyB/D, phyC und phyE eigene Untergruppen bilden. PhyA ist in seiner aktiven Form lichtlabil und an der so genannten VLFR (*very low fluence response*) und der Dunkelrot-induzierten HIR (*high irradiance response*) beteiligt (Shinamura *et al.*, 2000). Die Phytochrome B-E sind für die Rot/Dunkelrot reversiblen LFR (*low fluence response*) und die durch Dauer-Rotlicht induzierte HIR verantwortlich.

Phytochrome sind große Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 125 kDa und wurden bisher als Homodimere beschrieben, wobei lichtstabile Typ II Phytochrome (phyB-E) auch als Heterodimer nachgewiesen werden konnten (Sharrock und Clack, 2004). Phytochrome besitzen im N-Terminus eine Extension (NT), gefolgt von einer PAS (*Per-Arnt-Sim*) Domäne sowie einer so genannten GAF (cGMP phosphodiesterase/ adenylyl cyclase/ FhlA) Domäne an die der Chromophor Phytochromobilin, ein offenkettiges Tetrapyrrol, über eine Thioether Bindung mit einem Cystein (Cys 321, in phyA) an das Apoprotein kovalent gebunden ist. Danach folgt eine so genannte PHY Domäne (PAS ähnlich). Der C-Terminus besteht aus zwei aufeinander folgenden PAS Domänen, gefolgt von einer HKRD (*histidin-kinase-related-domain*) Domäne. Der N-Terminus vermittelt durch die Bindung von Phytochromobilin die lichtsensitiven Eigenschaften, während der C-Terminus für die Dimerisierung und die Signalweiterleitung des Photorezeptors bedeutend ist (Kevei und Nagy, 2003). Jedoch zeigten weitere Untersuchungen, dass der N-Terminus, fusioniert mit einer NLS (*nuclear localisation sequence*) und einer Dimerisierungs-Domäne, ausreichend ist für die Aktivität von Phytochrom im Zellkern (Matsushita *et al.*, 2003). Ebenso ist für die Interaktion von phyB und Cryptochrom im Prozess der Wurzel-Ergrünung unter Blaulicht kein C-Terminus notwendig (Usami *et al.*, 2007).

Phytochrome werden im Dunkeln in der physiologisch inaktiven Pr-Form (r = rot absorbierend) im Cytosol synthetisiert mit einem Absorptionsmaximum von ca. 665 nm und konvertieren nach Lichtabsorption (Hellrot) in die physiologisch aktive Pfr-Form mit einem Absorptionsmaximum von ca. 730 nm. Zusätzlich zu ihrer Absorption im spektralen Bereich von 600 nm bis 750 nm weisen Phytochrome noch eine Absorption in der Pr-Form bei 380 nm auf, die nach Konvertierung in die Pfr-Form bei 410 nm liegt. Diese Konvertierung in die Pfr-

Form ist nach Bestrahlung mit Dunkelrot reversibel (Mohr *et al.*, 1962, Briggs und Rice, 1972). Die spektrale Eigenschaft der Phytochrome ändert sich durch eine Konformationsänderung des Proteins, ausgelöst durch eine *cis-trans* Isomerisierung des Chromophors Phytochromobilin (Lagarias und Mercurio, 1985, Park *et al.*, 2000, Kendrick und Kronenberg, 1994).

Die Pfr-Form von phyA wird im Licht abgebaut, ebenso ist die Expression des *PHYA*-Gens im Licht unterdrückt, weshalb es hauptsächlich in etiolierten Keimlingen vorkommt. In De-etiolierten höheren Pflanzen überwiegen die lichtstabilen Typ II Phytochrome B-E (Übersicht Schäfer und Bowler, 2002).

Abhängig von der Intensität des einfallenden Lichtes wird zwischen drei Phytochromantworten unterschieden. Die VLFR (*very low fluence response*), die LFR (*low fluence response*) und die HIR (*high irradiance response*). Für die VLFR und HIR ist vorwiegend Phytochrom A verantwortlich, die durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht hoher Intensität und langer Bestrahlungszeit induziert werden. Beide Reaktionen weisen keine Photoreversibilität auf und eine geringe Menge an aktivem Phytochrom in der Pfr-Form reicht für Signalweiterleitung aus (Übersicht in Nagy und Schäfer, 2002). Für die Rot/Dunkelrot reversible LFR sind die Typ II Phytochrome B-E verantwortlich (Übersicht in Kevei und Nagy, 2003).

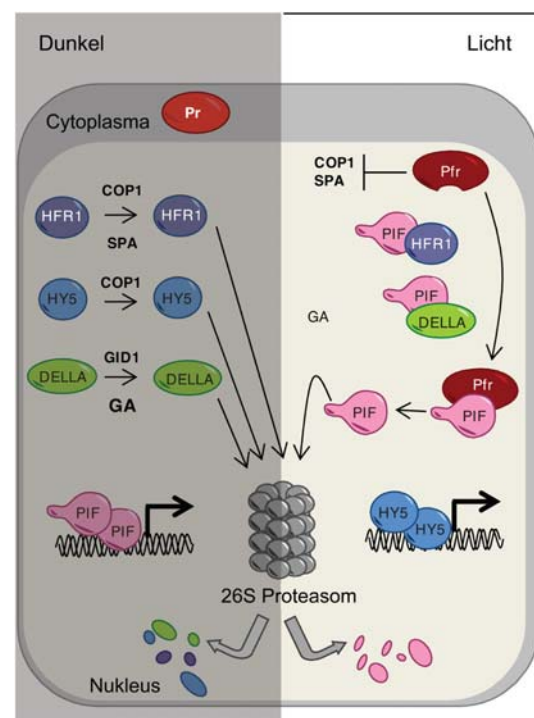
In den verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Pflanze überlappen sich die Funktionen der einzelnen Phytochrome. So ist die VLFR- und HIR-vermittelte Samenkeimung vornehmlich durch phyA kontrolliert, jedoch sind ebenfalls phyB und phyE an der Regulation beteiligt (Hennig *et al.*, 2002). Die Induktion nach kurzer Rotlichtbestrahlung (1h) von zahlreichen Genen ist phyA reguliert (Tepperman *et al.*, 2001, 2006), obwohl phyA insbesondere für die Perzeption von dunkelrotem Licht verantwortlich ist. Deetiolierung und Längenwachstum des Sprosses sind vornehmlich über die LFR durch phyB reguliert. Das Internodienwachstum sowie der Blühzeitpunkt werden durch phyD und phyE reguliert und zusammen mit phyB regulieren diese Phytochrome noch die Schattenvermeidungsreaktion (*shade avoidance response*).

Das Apoprotein von PHYA wurde mittels Immunodetektion bei im Dunkeln gewachsenen Keimlingen vorwiegend in den Wurzelspitzen, in der Region des apikalen Hackens sowie in der Epidermis junger Blätter nachgewiesen (Hisada *et al.*, 2000). Phytochrom A wird im Dunkeln im Cytosol synthetisiert und ist nach Hellrot Perzeption bereits nach 10 min im Nukleus lokalisiert. Dunkelrot ist ebenfalls ein Auslöser für den Import von phyA in den Nukleus. PhyB wird durch Hellrot Bestrahlung importiert, doch ist dieser Prozess langsamer als bei phyA. Beide Phytochrome werden in der physiologisch aktiven Pfr-Form in den Nukleus transportiert, wo sie dann mit verschiedenen Zielproteinen interagieren und somit eine Licht-abhängige Regulation zahlreicher Gene ermöglichen. Ein Teil des Phytochroms

verbleibt im Cytosol (Sakamoto und Nagatani, 1996, Kircher *et al.*, 1999, Yamaguchi *et al.*, 1999) wo cytosolische Prozesse wie die Inhibierung des Gravotropismus oder die Blaulicht vermittelte Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums unter ihrem Einfluss liegen (Rösler *et al.*, 2007). Die Antwort der Phytochrome nach Lichtperzeption ist auch abhängig von dem Phosphorylierungs-Zustand des Photorezeptors. Hierüber werden die subzelluläre Lokalisation, die Stabilität und die Affinität zu *down-stream* Signalkomponenten reguliert. Die lichtabhängige Translokation in den Nukleus und die daraus resultierende schnelle Regulation von Genen wird durch die Interaktion von phyA und phyB im Zellkern mit den PIF-Proteinen (*Phytochrom Interacting Factor*) ermöglicht. In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher 15 PIFs identifiziert (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003), welche zu der bHLH (*basic-helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktoren-Familie gezählt werden. Zwölf dieser PIFs besitzen N-terminal eine APB (*active phytochrom binding motif*) Domäne, die ausreichend für eine Bindung mit der aktiven Pfr-Form von phyB ist (Khanna *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass PIF1, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6 und PIF7 mit phyA und phyB *in vitro* interagieren

**Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Einflusses der Phytochrome auf die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren.**

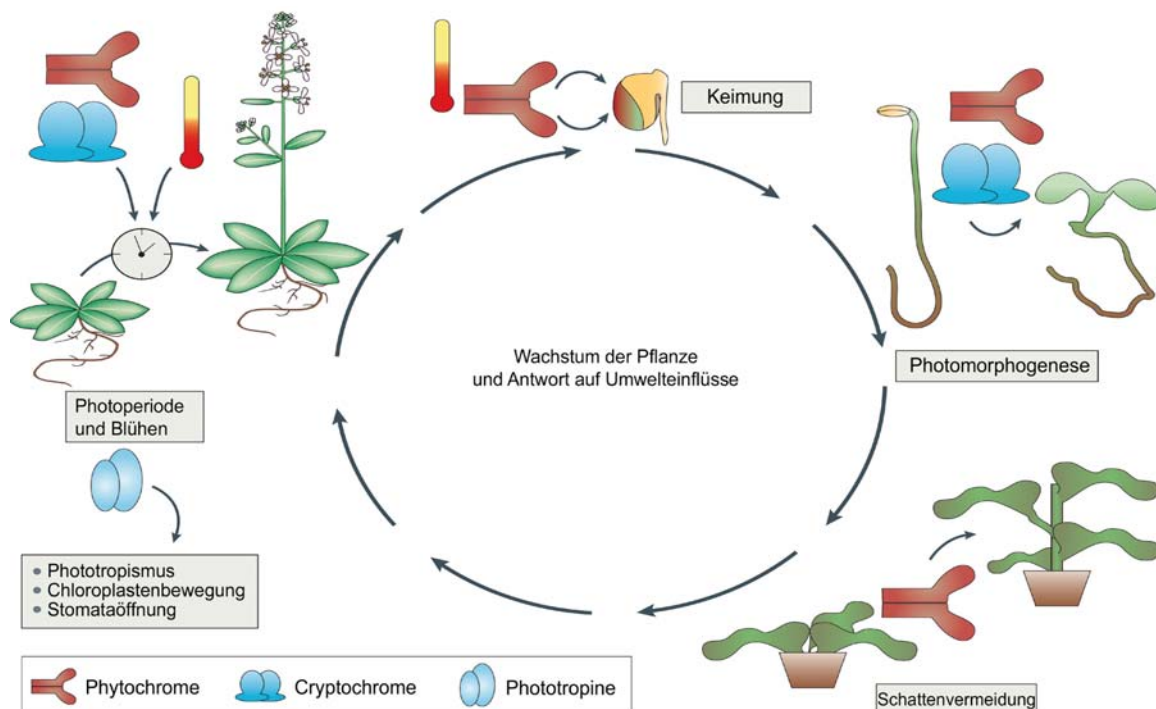
Im Dunkeln liegt Phytochrom in seiner inaktiven Pr-Form im Cytoplasma vor. COP1 ist assoziiert mit den SPA-Proteinen und führt zur Degradation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie HY5 und HFR1. Die PIF Proteine bleiben stabil und beeinflussen die etiolierte Entwicklung der im Dunkeln wachsenden Keimlinge. Nach Lichteinfall konvertieren die Phytochrome in ihre aktive Pfr-Form. Es folgt eine Translokation in den Nukleus und eine dadurch bedingte Inaktivierung von COP1 sowie eine Degradation verschiedener PIFs. Zusätzliche erfolgt eine Inaktivierung der PIFs durch deren Heterodimerisierung mit den Proteinen DELLA und HFR1. Die Inaktivierung durch Dimerisierung mit HFR1 ist abhängig von den Lichtbedingungen. Unter Dunkelrot Licht sind die PIF Proteine stabil und es kommt zur Akkumulation von HFR1. Die Konzentration der DELLA Proteine ist durch GA reguliert. Ein hohes GA-Level in etiolierten Keimlingen führt zu einer rascheren Degradation von DELLA Proteinen. Abbildung aus Kami *et al.*, (2010)



können, wobei PIF1 eine höhere Affinität zu phyB als zu phyA besitzt (Zhu *et al.*, 2000, Ni *et al.*, 1999, Übersicht in Castillon *et al.*, 2007, Leivar *et al.*, 2008a). Alle PIF Proteine, mit Ausnahme von PIF7, werden nach der Interaktion mit Phytochromen proteasomal abgebaut. PIF Proteine bilden Homo- oder Heterodimere auch mit anderen bHLH Transkriptionsfaktoren wie HFR1 (*long hypocotyl in far red 1*) und binden regulatorische Elemente ihrer Zielgene, so genannte G-Boxen. Diese Sequenzmotive (5'-CACGTG-3') finden sich in vielen lichtregulierten Genen (Martinez-Garcia *et al.*, 2000) (Abb.1.3). Die



unterschiedlichen Funktionen der einzelnen PIF-Proteine wurden durch phänotypische Analysen von verschiedenen *pif*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* aufgeklärt. So reguliert PIF1 unter anderem die Repression der lichtabhängigen Keimung, die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums, die Chlorophyll-Akkumulation im Licht und dient zudem als Regulator der Chlorophyll-Biosynthese (Huq *et al.*, 2004, Oh *et al.*, 2004). PIF4, PIF5 und PIF7 wirken ebenfalls als negativer Regulator der lichtinduzierten Photomorphogenese (Huq and Quail 2002, Fujimori *et al.*, 2004, Leivar *et al.*, 2008a). Für PIF3 konnte eine positive Regulation im Bezug auf die Chloroplasten-Entwicklung und die Anthocyan-Biosynthese nachgewiesen werden (Monte *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2003), die zusammen mit HY5 (*elongated hypocotyl 5*) reguliert werden. Eine biologische Funktion für PIF6 konnte bisher nicht gezeigt werden.



**Abb. 1.4 Lichtregulierte Entwicklung von Pflanzen. Einfluss einzelner Photorezeptoren** Bei der Licht induzierten (LFR (*low fluence response*)) Keimung kontrollieren die Phytochrome die Dunkelrot Reversibilität dieses Prozesses. Bei der Steuerung dieser Rot/Dunkelrot reversiblen Induktion der Keimung sind die Phytochrome PHYA, PHYE und PHYG beteiligt, wobei PHYG den größten Einfluss hat. Die Photomorphogenese wird durch ein breites Spektrum an Licht, nämlich Rot, Dunkelrot, Blau und UV-Licht ausgelöst. In *Arabidopsis thaliana* ist unter Dunkelrotlicht PHYA, unter Weiß- und Rotlicht PHYG und unter Blau- und UV-Licht sind CRY1 und CRY2 die primären Photorezeptoren der Photomorphogenese. Die Schattenvermeidungsreaktion (*shade avoidance response*) wird durch den relativen Anteil an der Pr-Form zu der Pfr-Form ausgelöst, die abhängig ist von dem veränderten Rot/Dunkelrot Verhältnis, und hauptsächlich über PHYG gesteuert wird. In *Arabidopsis thaliana* wird die Synchronisation der circadianen Uhr durch ein Zusammenspiel von Cryptochromen und Phytochromen erreicht und die Perzeption der Tageslänge ist unter anderem ein wichtiges Signal für die Blühinduktion. Prozesse wie Phototropismus, Chloroplasten Bewegung oder die Bewegung der Schließzellen der Stomata stehen im Wesentlichen unter der Kontrolle der Phototropine. Abbildung aus Jiao *et al.* (2007).

Direkte Zielgene für die verschiedenen PIF Proteine konnten bisher nur für PIF1 nachgewiesen werden. So aktiviert PIF1 im Dunkeln die DELLA Gene *GAI* und *RGA* (Oh *et al.*, 2007). Für PIF3 konnte eine direkte Interaktion mit bestimmten Promotoren

verschiedener Gene, die an der Anthocyan-Biosynthese beteiligt sind, nachgewiesen werden (Shin *et al.*, 2009).

Das sich daraus ergebende Modell sieht folgendermaßen aus: Im Dunkeln sind die PIF-Proteinen aktiv und fördern die Expression von Genen wie GAI und RGA, was reprimierend auf die Photomorphogenese wirkt. Durch lichtabhängige Translokalisierung der Phytochrome in den Zellkern und anschließender Interaktion der Pfr-Form mit den PIF-Proteinen werden diese phosphoryliert und nach einer Poly-Ubiquitinierung über das 26S Proteasom abgebaut. Die negative Regulation der Photomorphogenese wird somit aufgehoben und durch die Reduktion der Expression der GAI- und RGA -Gene wird z.B. die Samenkeimung im Licht stimuliert (Castillon *et al.*, 2007).

Weitere Interaktionspartner von Phytochrom sind zum einen PKS1 (*phytochrom kinase substrate 1*), welches durch Phytochrom A *in vitro* phosphoryliert wird (Fankhauser *et al.*, 1999) und zum anderen NPK2 (Choi *et al.*, 1999), das Phytochrom in der Pfr- Form bindet, wodurch die Aktivität rekombinanter Nukleosid-Diphosphat-Kinase 2 *in vitro* gesteigert wird. Die physiologische Relevanz dieser beiden Interaktionspartner und ihrer Funktion in der Signaltransduktion liegt im Bereich des Phototropismus sowie in der Schattenvermeidungsreaktion (*shade avoidance response*).

### 1.3 Blaulichtperzeption: die UV-A/Blaulichtphotorezeptoren

#### 1.3.1 Phototropine

Das schon früh beobachtete Phänomen des Phototropismus (Darwin, 1881) wurde erstmals mit einem Protein in Verbindung gebracht, welches abhängig von Blaulicht Bestrahlung phosphoryliert wird und Membran assoziiert ist (Gallagher *et al.*, 1988). In *Arabidopsis thaliana* wurden diese Proteine in den 1990er Jahren als NPH1 (*non phototropic hypocotyl 1*; jetzige Bezeichnung PHOT1) und das nah verwandte NPL1 (*nph1 like* jetzt PHOT2) identifiziert (Liscum und Briggs 1995; Huala *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2001; Christie *et al.*, 1998).

Die Phototropine sind ca. 120 kDa große Flavoproteine die in *Arabidopsis thaliana* mit Plasmamembranen assoziiert gefunden wurden (Sakamoto und Briggs 2002; Harada *et al.*, 2003) und Strahlung im Blau-/UV-A Bereich absorbieren. Phototropine besitzen N-terminal zwei photosensorische ca. 110 Aminosäuren große LOV- Domänen (*Light, Oxygen, Voltage*), an die zwei FMN-Moleküle (Flavinmononukleotid) im Dunkeln nicht-kovalent gebunden sind (Abb.1.2). Nach Bestrahlung wird durch die kovalente Bindung der Chromophoren eine Konformationsänderung über eine  $\alpha$ -Helix im Protein ausgelöst, die die Aktivierung der C-terminalen Kinase, eine klassische Ser/Thr-Kinase, und die daraus



resultierende Signalweiterleitung auslöst. Diese kovalente Bindung ist in Form von *Light Induced Absorbance Changes* (LIAC) detektierbar und ist dunkelreversibel (Salomon *et al.*, 2000). Im Dunkeln sind die C-terminale Kinase und N-terminale photosensorische Domäne wahrscheinlich miteinander assoziiert. Durch Lichtabsorption könnte diese Assoziation unterbrochen werden, wodurch die Kinase Domäne aktiviert wird (Harper *et al.*, 2003).

Bisher konnte aber nur eine Autophosphorylierung beider Phototropine nach Blaulichtbestrahlung nachgewiesen werden (Christie *et al.*, 1998, 2002; Sakai *et al.*, 2001). Diese Autophosphorylierung führt zu einer Interaktion mit weiteren Signalkomponenten (Sakai *et al.*, 2000; Inada *et al.*, 2004; Sakamoto und Briggs, 2002) wobei entsprechende Substrate für die Kinase Domäne nicht ausgeschlossen werden können (Matsuoka und Tokutomi, 2005).

Beide Phototropine PHOT1 und PHOT2 sind bei der Regulation von Blaulicht-gesteuerten Bewegungsprozessen beteiligt und besitzen eine unterschiedliche Lichtsensitivität (Gyula *et al.*, 2003) bzw. haben unterschiedliche photochemische Eigenschaften (Sakai *et al.*, 2001). Beide Phototropine sind verantwortlich für die optimale Ausnutzung des Lichts und die damit verbundene Adaption der externen Umweltbedingungen (Briggs und Christie 2002; Christie *et al.*, 2007) (Abb.1.4).

Der Phototropismus des Hypokotyls wird im Starklicht von beiden, im Schwachlicht nur von PHOT1 vermittelt. Die Blattexpansion (Sakamoto und Briggs, 2002) und Bewegungsprozesse wie die Relokalisation der Chloroplasten werden durch beide Phototropine vermittelt. Die Akkumulationsbewegung (Kagawa *et al.*, 2003), also die Bewegung zur Lichtseite, sowie die Vermeidungsbewegung (Kasahara *et al.*, 2002) von Chloroplasten bei entsprechender Lichtintensität wird durch Phototropine gesteuert. PHOT1 vermittelt die Akkumulationsantwort, PHOT2 die Vermeidungsreaktion. Des Weiteren wird die blaulichtabhängige Bewegung der Schließzellen der Stomata (Kinoshita *et al.*, 2001) und die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Phototropinen reguliert. Zusätzlich sind Phototropine zusammen mit Cryptochromen an der frühen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums nach Blaulichtbestrahlung (Folta und Spalding, 2001) und an dem Kotschydonen- und Blattflächenwachstum (Ohgishi *et al.*, 2004) beteiligt.

### 1.3.2 Zeitlupe Familie

Eine weitere Gruppe der Blaulicht Photorezeptoren ist die so genannte Zeitlupe-Familie. Pflanzen steuern ihren angepassten Lebenszyklus an Tag und Nacht über die endogenen Uhr, die die circadiane Rhythmik steuert. Bei Untersuchung der Lichtsteuerung der circadianen Rhythmik in *Arabidopsis thaliana* konnten bisher drei Vertreter dieser Zeitlupen-Familie identifiziert werden, nämlich ZTL (Zeitlupe), FKF1 (*flavin-binding, kelch repeat, F-box*) und

LKP2 (*LOV kelch protein*). Alle drei sind an der Regulation des Blühzeitpunktes unter Langtagbedingungen und der Regulation der circadianen Rhythmik beteiligt (Somers *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001; Imaizumi *et al.*, 2003). Diese Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz auf und besitzen die gleiche Kombination aus drei verschiedenen Domänen (Abb.1.2). N-terminal befindet sich eine LOV-Domäne deren Chromophor FMN einen Photozyklus durchläuft, der dem der Phototropine ähnelt (Somers *et al.*, 2001; Somers *et al.*, 2004), wobei eine Dunkelreversion noch nicht beobachtet werden konnte (Imaizumi *et al.*, 2003) (Abb.1.2). Des Weiteren besitzen alle Proteine der Zeitlupe-Familie weiter C-terminal eine F-BOX Domäne gefolgt von sechs Kelch-Motiven. Diese beiden Domänen sind vermutlich für die Markierung bzw. Ubiquitinierung und den darauf folgenden proteasomalen Abbau bestimmter Zielproteine zuständig. F-BOX Proteine sind als Bestandteile der SFC-Typ E3-Ligase an der Ubiquitinierung und des späteren Abbaus von Zielproteinen durch das Proteasom beteiligt. Kelch-Motiv Wiederholungen sind häufig bei Protein-Protein Interaktion bedeutend.

Eine Funktion als Photorezeptor von FKF1 konnte in der Regulation des photoperiodischen Blühzeitpunktes nachgewiesen werden. So reguliert FKF1 positiv die Genexpression des *CONSTANS* (CO) Gens. Unter Langtagbedingungen akkumuliert das Protein CO am späten Tag, während es morgens proteasomal abgebaut wird. Trifft nun eine hohe Menge an CO mit einem Lichtsignal zusammen, so wird die Expression von FT (*Flowering Locus T*) induziert (Imaizumi *et al.*, 2005; 2010), einem zweiten wichtigen Faktor in der Blühinduktion, wodurch letztendlich die Blütenbildung ausgelöst wird (Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004). FKF1 reguliert hierbei indirekt die Expression von CO über die Stabilität eines Repressors, namentlich CDF1 (*Cycling DOF Factor 1*). FKF1 bindet nach Blaulichtanregung mit GIGANTEA (GI) und interagiert im Komplex mit diesem mit CDF1. Der Repressor CDF1 wird dadurch abgebaut und die Expression von CO induziert (Sawa *et al.*, 2007).

Die Expression von GI wird durch die circadiane Rhythmik reguliert und GI bindet lichtabhängig auch ZTL, wodurch auch die diurnale Regulation der Konzentration des Proteins ZTL erklärt werden kann, obwohl die mRNA konstitutiv exprimiert wird (Kim *et al.*, 2007). Ein weiterer zentraler Bestandteil des Oszillators der Inneren Uhr, TOC1 (*Timing of CAB Expression 1*) wird durch ZTL als Stabilisator gesteuert. ZTL markiert TOC1 für den proteasomalen Abbau und es wird angenommen, dass eine Interaktion von ZTL und GI die Ubiquitinierung von ZTL-Zielproteinen wie TOC1 inhibiert. Somit ist gewährleistet, dass TOC1 einer diurnalen Rhythmik mit hoher Amplitude unterliegt (Mas *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

Die Regulation von TOC1 hat eine Schlüsselrolle bei der täglichen Justierung des zentralen Oszillators der Inneren Uhr bei *Arabidopsis thaliana* durch Licht, der alle 24 h erfolgt. Als weitere zentrale Bestandteile wurden bisher die Morgen-spezifischen Gene und ihre

exprimierten Proteine LHY (*Late Elongated Hypokotyl*) und CCA1 (*Circadian Clock-Associated 1*) identifiziert. Diese beeinflussen die Expression des Abend-spezifischen Regulators TOC1 negativ (Wang und Tobin 1998; Schaffer *et al.*, 1998; Strayer *et al.*, 2000) und bilden eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife. TOC1 stimuliert die Expression von LHY/CCA1 am frühen Abend. Dadurch steigt die Proteinmenge von LHY/CCA1, welche am Morgen die TOC1 Expression inhibieren, indem sie direkt an die Elemente des TOC1-Promotors binden. Dadurch wird wiederum die LHY/CCA1 Konzentration abgesenkt, was die TOC1 Expression und die daraus resultierende LHY/CCA1 Expression stimuliert (Alabadi *et al.*, 2001). Neben ZTL sind auch die Cryptochrome und Phytochrome an der täglichen Synchronisation der Inneren Uhr beteiligt.

### 1.3.3 Cryptochrom/Photolyase-Familie

Cryptochrome bilden die dritte Klasse der UV-A/Blaulichtphotorezeptoren und wurden zuerst in den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* identifiziert (Ahmad und Cashmore, 1993; Batschauer, 1993). Mittlerweile konnten Mitglieder dieser Familie ubiquitär auch in Vertretern aller drei Reiche nachgewiesen werden. Ihr Name leitete sich aus der lange unbekannten (kryptischen) molekularen Natur der Blaulichtrezeptoren ab, da ihre physiologische Wirkungsweise in Pflanzen schon länger bekannt war. Cryptochrome sind ca. 50-80 kDa große Flavoproteine die auf Sequenz- und Strukturebene eng verwandt sind mit DNA-Photolyasen (Ahmad and Cashmore, 1993; Sancar *et al.*, 2003, 2008; Partch und Sancar, 2005). Dies sind Enzyme die UV-A und Blaulicht zur Reparatur von DNA-Schäden wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) nutzen. Daher werden Cryptochrome und Photolyasen auch als Cryptochrom/Photolyase-Familie zusammengefasst. Im Unterschied zu Photolyasen besitzen sie mit einigen Ausnahmen keine DNA-Reparatur Aktivität und agieren somit als Photorezeptoren (Lin *et al.*, 1995a; Malhotra *et al.*, 1995). In Pflanzen sind Cryptochrome hauptsächlich an Entwicklungsprozessen wie der Deetiolierung, der photoperiodischen Blühinduktion und dem Stellen der Inneren Uhr beteiligt. Im Tierreich haben Cryptochrome hauptsächlich Einfluss auf die endogene Rhythmik und werden als mögliche Magnetrezeptoren diskutiert (Übersicht in Cashmore *et al.*, 2003; Ritz *et al.*, 2009). Neben den pflanzlichen und tierischen Cryptochromen wurde durch Sequenzvergleich in photosynthetischen Cyanobakterien mit den DASH-Cryptochromen eine dritte Unter-Familie identifiziert und somit das Vorkommen von Cryptochromen auch in Prokaryoten nachgewiesen (Hitomi *et al.*, 2000; Brudler *et al.*, 2003). DASH-Cryptochrome konnten bis heute auch in anderen Organismen wie Pilze, Pflanzen und Tiere nachgewiesen werden (Daiyasu *et al.*, 2004; Kleine *et al.*, 2003). In dem Pilz *Aspergillus nidulans* wurde mit CRYA ein Mitglied der Cryptochrom/Photolyase entdeckt, welches sowohl eine Photolyase- als auch eine Cryptochrom-ähnliche Funktion aufweist (Bayram *et al.*, 2008). Eine Übersicht

über den Kenntnisstand von Cryptochromen geben folgende Übersichtsartikel: Banerjee und Batschauer, (2005); Batschauer, (2003); Cashmore, (2003); Lin und Shalitin, (2003); Partch und Sancar, (2005); van Gelder, (2003).

#### 1.3.3.1 Evolution der Cryptochrome /Photolyase-Familie

Die Hypothese, dass Cryptochrome sich unabhängig aus einem gemeinsamen CPD-Photolyase Vorläufer in Tieren und Pflanzen nach der Aufspaltung von Prokaryoten und Eukaryoten entwickelt haben, wurde erstmals von Cashmore *et al.*, (1999) postuliert. Nach der Entdeckung von Cryptochromen in Prokaryoten (Hitomi *et al.*, 2000) und dem Befund, dass die Klasse der CRY-DASH Cryptochrome im Unterschied zu den „klassischen“ tierischen und pflanzlichen Cryptochromen eine Photolyase Aktivität aufweisen, führte zu einem anderen Blickwinkel auf die Evolution der Cryptochrome. Das Vorkommen der Klasse der CRY-DASH Rezeptoren in Pflanzen, Pilzen, Bakterien, Archea und einigen Wirbeltieren unterstützt die Annahme, dass ein gemeinsamer Ursprung für tierische und pflanzliche Cryptochrome besteht (Daiyasu *et al.*, 2004). Die engere Verwandtschaft von CRY-DASH aus *Arabidopsis thaliana* zum prokaryotischen Vertreter von CRY-DASH aus *Synechocystis sp.* als zu AtCRY1 und AtCRY2 ist ein weiteres Argument hierfür (Kleine *et al.*, 2003; Brudler *et al.*, 2003).

Phylogenetische Analysen von mehr als 250 Genen aus der Familie der Cryptochrom/Photolyase Familie unterteilt diese in neun Hauptgruppen (Öztürk *et al.*, 2008a, 2008b) und entwickelten Sie sich nach Kanai *et al.* (1997) durch Genduplikationen aus einem Vorläufer der CPD-Photolyasen. Die neun Klassen teilen sich wie folgt auf: Die CPD-Photolyasen bilden drei Klassen, wobei die Klasse I in prokaryotischen Mikroorganismen zu finden ist wie z.B. in *E. coli*, in Cyanobakterien wie *Synechocystis sp.* und in einzelligen, niederen Eukaryoten wie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Klasse II ist in vielzelligen Eukaryoten wie *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster* vertreten, sowie in tierischen Viren (Sancar *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005). Die Klasse III der CPD-Photolyasen wurde aufgrund der höheren Sequenzähnlichkeit zu pflanzlichen Cryptochromen als eigene Klasse definiert und ein Vertreter ist z.B. die CPD-Photolyase aus dem Bakterium *Caulobacter crescentus*.

Die pflanzlichen Cryptochrome bilden mit den Klasse I und III CPD-Photolyasen sowie den CRY-DASH Cryptochromen aufgrund ihrer Verwandtschaft einen phylogentischen Hauptast im Gegensatz zu den tierischen Cryptochromen, die näher mit den (6-4)-Photolyasen verwandt sind. Bei den tierischen Cryptochromen wird die Gliederung in mehrere

Unterklassen abhängig von Ihrer Funktion *in vivo* unternommen. Tierisches CRY2 Cryptochrom ist enger verwandt mit (6-4)-Photolyasen als mit ihren tierischem CRY1 Cryptochrom Vertretern.

#### 1.3.3.2 Photolyasen und AtCRY3 (CRY-DASH)

DNA-Photolyasen kommen in einer Vielzahl von Organismen aus allen drei Reichen vor (Li *et al.*, 1993). Die Proteine tragen stöchiometrisch zwei nicht kovalent gebundene Chromophore als Kofaktoren (Jorns *et al.*, 1984, Johnson *et al.*, 1988). Als der redoxaktive katalytische Kofaktor dient das Flavinadenindinukleotid (FAD) (Payne *et al.*, 1990) und als zweiter Antennenkofaktor entweder ein Folat, das 5,10-Methenyltetrahydrofolat (5,10-MethenylTHF) (Johnson *et al.*, 1988) oder ein Deazaflavin, das 8-Hydroxy-7,8-Didemethyl-5-Deazariboflavin (8-HDF) (Eker *et al.*, 1990; Sancar und Sancar, 1988). Neuere Daten zeigen jedoch, dass auch FAD oder FMN die Funktion als Antennenchromophor übernehmen können (Fujihashi *et al.*, 2007, Ueda *et al.*, 2005, Klar *et al.*, 2006). Die DNA-Photolyasen sind für die lichtabhängige Reparatur von UV-B induzierten DNA-Schäden verantwortlich und können je nach Natur des von ihnen reparierten DNA-Schadens, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) bzw. Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte, in die CPD- und (6-4)-Photolyasen untergliedert werden (Review Sancar 2003, 2008).

Die Lösung der Kristallstrukturen verschiedener CPD-Photolyasen (Park *et al.*, 1995, Tamada *et al.*, 1997, Komori *et al.*, 2001) zeigte für alle Proteine denselben generellen Domänenaufbau, bestehend aus einer N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne, einer C-terminalen  $\alpha$ -Domäne, sehr ähnlichen Substratbindetaschen und die Einbindung des Flavin Kofaktors. Die höchste Konservierung findet sich im Bereich der FAD-Bindungstasche in dem das FAD in einer ungewöhnlichen U-förmigen Konformation gebunden ist (Park *et al.*, 1995). Die Fixierung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt über van-der-Waals Kräfte zwischen dem katalytischen FAD und dem DNA-Schaden (Vande Berg und Sancar, 1998, Komori *et al.*, 2001, Christine *et al.*, 2002) und die Bindung des DNA-Stranges über eine sich entlang des Enzyms ziehenden Furche mit konservierten Aminosäuren, die der Oberfläche ein positives elektrostatisches Potenzial verleihen und eine sequenzunspezifische Interaktion mit dem Phosphatrückgrat der DNA erlauben (Baer und Sancar, 1989, Mees *et al.*, 2004). Der postulierte Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyasen erfolgt ausgehend vom angeregten  $\text{FADH}^{*-}$ , das ein Elektron auf den DNA-Schaden übertragen kann (Park *et al.*, 1995). Das kurzfristig entstehende neutrale Flavin-Radikal  $\text{FADH}^{\bullet}$  wird nach spontaner Spaltung des Cyclobutanrings (*Cycloreversion*) des anionischen Pyrimidin-Dimer-Radikals wieder durch Rückübertragung des Elektrons zum katalytisch aktiven  $\text{FADH}^{-}$  regeneriert. Die Lichtanregung des FAD-Kofaktors erfolgt dabei entweder direkt oder mittels Förster-Energie-

Transfer (FRET) vom im UV-A/Blaubereich absorbierenden Antennencofaktor 5,10-MethenylTHF (Johnson *et al.*, 1988; Ramsey *et al.*, 1992). *In vivo* liegt in Photolyasen die vollständig reduzierter, anionischer FADH<sup>-</sup>-Form vor, im Gegensatz zu der *in vitro* auftretenden Oxidation zum FADH<sup>•</sup>-Radikals und zu FAD<sub>ox</sub> (Payne *et al.*, 1987). Die verschiedenen Redoxzustände des FAD-Cofaktors unterscheiden sich in ihren Redoxpotentialen und besitzen unterschiedliche Absorptionseigenschaften. In Gegenwart eines externen Elektronendonors können diese Formen jedoch photochemisch wieder in die aktive FADH<sup>-</sup>-Form überführt werden (Sancar *et al.*, 2003), ein Prozess, der als Photoreduktion oder Photoaktivierung bezeichnet wird (Heelis und Sancar, 1986). Dieser Prozess involviert den sequentiellen Elektronentransfer über drei Tryptophanreste, der Tryptophan-Triade, die sowohl in den bisher charakterisierten Photolyasen, als auch in den Cryptochromen konserviert ist (Aubert *et al.*, 2000, Byrdin *et al.*, 2003).

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* ermöglichte die Identifizierung eines weiteren Mitgliedes der Cryptochrom/Photolyase-Familie neben dem bereits entdeckten CRY1 und CRY2 (Brudler *et al.*, 2003, Kleine *et al.*, 2003). Da für dieses Mitglied keine DNA-Reparaturaktivität für UV Schäden nachgewiesen werden konnte, wurde es folglich den Cryptochromen zugeordnet und als Cryptochrom 3 (AtCRY3) bezeichnet (Kleine *et al.*, 2003). CRY3 kann einer Unterklasse, den CRY-DASH Proteinen, zugeordnet werden und ist in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert (Kleine *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den pflanzlichen und tierischen Cryptochromen ist die *in vivo* Funktion der CRY-DASH Proteine weitgehend unbekannt. Die Kristallstrukturen des bakteriellen CRY-DASH aus *Synechocystis sp.* und von AtCRY3 zeigen den bereits für die *E.coli* DNA Photolyase beschriebenen Aufbau (Park *et al.*, 1995) aus einer N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne und einer FAD-bindenden C-terminalen  $\alpha$ -Domäne. Neben der charakteristischen U-förmigen Konformation des FAD-Cofaktors ist auch die zur Photoreduktion essentielle Tryptophan-Triade strukturell konserviert (Brudler *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Klar *et al.*, 2007). Im Widerspruch zur vorherigen Annahme einer fehlenden DNA-Reparaturaktivität der Mitglieder der CRY-DASH-Familie konnten im Nachhinein eine Reparaturaktivität dieser Proteine für CPD-Schäden nachgewiesen werden, die jedoch spezifisch für Einzelstrang-DNA ist (Selby und Sancar, 2006), bzw. für Doppelstrang-DNA (dsDNA), wenn die DNA sich im Bereich des Schadens partiell in Einzelstränge aufgliedert (Pokorny *et al.*, 2008).

### 1.3.3.3 Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*

#### Entdeckung und Verbreitung

Cryptochrome sind im gesamten Reich der Pflanzen weit verbreitet und konnten bereits in Höheren Pflanzen wie Reis (Matsumoto *et al.*, 2003), Tomate (Ninu *et al.*, 1999; Perrotta *et al.*, 2000, 2001) Algen (Small *et al.*, 1995), Moosen (Imaizumi *et al.*, 2002) und in Farnen (Kanegae und Wada, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000) identifiziert werden. Dabei variiert die Anzahl der Cryptochrome in den einzelnen Organismen. In *Arabidopsis thaliana* gibt es neben CRY3 als Mitglied der CRY-DASH-Cryptochrome zwei weitere Cryptochrome mit der Bezeichnung Cryptochrom 1 (CRY1) und Cryptochrom 2 (CRY2).

Cryptochrom 1 wurde in einem Screen nach *Arabidopsis thaliana* Mutanten von T-DNA Linien identifiziert (Ahmad und Cashmore, 1993), die denselben Phänotyp aufwiesen wie die zuvor beschriebene Mutante *hy4* (Koornneef *et al.*, 1980). Die Keimlinge dieser Mutante besitzen im Gegensatz zum Wildtyp ein langes Hypokotyl, wenn diese unter Weiß- oder Blaulicht angezogen werden. Angezogen im Dunkeln oder unter Rot- bzw. Dunkelrotlicht ist das Hypokotyllängenwachstums normal (Ahmad und Cashmore, 1993; Jackson und Jenkins 1995). Das führte zu der Vermutung, dass in dieser Mutante entweder eine Komponente der Blaulicht Signaltransduktion oder aber ein Gen kodierend für einen Blaulicht Photorezeptor defekt ist. Die Insertion einer T-DNA ermöglichte die Klonierung des Gens *HY4*. Die nachfolgende Sequenzanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit mit den Klasse I CPD-Photolyasen, trotz fehlender Photolyase Reparatur Aktivität (Lin *et al.*, 1995b; Malhotra *et al.*, 1995). Dies ließ den Schluss zu, dass es sich hierbei um einen Blaulicht Photorezeptor handelt und *HY4* wurde umbenannt in Cryptochrom 1 (Lin *et al.*, 1995a und b), ein Begriff der vorher schon für unbekannte Blaulicht Photorezeptoren geläufig war (Gressel *et al.*, 1977; Senger *et al.*, 1984). Durch PCR-Amplifikation einer cDNA Bibliothek von *Sinapis alba* mit degenerierten Oligonukleotiden, die Ähnlichkeiten mit konservierten Regionen von Klasse I CPD-Photolyasen hatten, konnte ein weiteres Cryptochrom Gen isoliert werden (Batschauer, 1993). Diese Klonierung war die Grundlage für die spätere Identifizierung eines zweiten Cryptochrom Gens aus *Arabidopsis thaliana*, namentlich Cryptochrom 2 (CRY2) (Hoffman *et al.*, 1996).

#### Domänen und Struktur

Wie schon erwähnt, besitzen beide Cryptochrome CRY1 und CRY2 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Klasse I CPD-Photolyasen. Im N-terminalen Bereich der pflanzlichen Cryptochrome, der aus ca. 500 Aminosäuren besteht, liegt die Ähnlichkeit auf Protein Ebene bei ca. 30% zur *E.coli* Photolyase. Daher wird dieser Bereich auch als PHR-Domäne (*Photolyase related*) bezeichnet. Die PHR-Domäne von CRY2 ist zu 58% identisch

mit der PHR-Domäne von CRY1. Diese Domäne ist auch essentiell für die Lichtperzeption, da hier nicht-kovalent die beiden Chromophore, FAD (Flavin-Adenin Di-Nukleotid) und MTHF (Methenyltetrahydrofolat) binden (Malhotra *et al.*, 1995). Beide Chromophore konnten in rekombinantem CRY1 und CRY2 nachgewiesen werden. Trotz der hohen Sequenzhomologie mit *E.coli* Photolyase besitzen CRY1 und CRY2 keine Photolyase Aktivität (Lin *et al.*, 1995; Malhotra *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1996). Zusätzlich zur PHR-Domäne besitzen viele Cryptochrome verschiedener Organismen sowie AtCRY1 und AtCRY2 eine C-terminale Extension (oder CCT-Domäne), die sich in ihrer Länge und Sequenz unterscheiden (Cashmore *et al.*, 1999) (Abb.1.2). Signalweiterleitung nach Lichteinfall und Interaktion werden über diese C-terminale Extension vermittelt und sind wichtig für die biologische Funktion der Cryptochrome. Dies wurde unter anderem in Experimenten gezeigt, wo die C-terminale Extension von CRY1 an die PHR-Domäne von CRY2 fusioniert wurde und umgekehrt. Beide Fusions-Proteine wiesen biologische Aktivität auf (Ahmad *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigten Pflanzen, die den C-Terminus von CRY1 oder CRY2 als Fusion mit dem Reporterprotein  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) exprimieren, eine konstitutive Photomorphogenese (Yang *et al.*, 2000). Im Dunkeln besitzen diese Pflanzen ein kurzes Hypokotyl und eine erhöhte Menge an Anthocyan (*cop* Phänotyp). Transgene Pflanzen, die GUS-Fusionen mit den N-terminalen Domänen von CRY1 und CRY2 exprimierten, zeigten diesen Phänotyp nicht. Diese chimären Proteine funktionierten also nicht als konstitutiv aktive Cryptochrome, ein weiterer Beleg für die Bedeutung der C-terminale Extension für die Signalweiterleitung des Lichtreizes.

Neben den Sequenzunterschieden in der C-terminalen Extension findet sich in den Cryptochromen von Landtagpflanzen eine konservierte Domäne, die als DAS-Motif bezeichnet wird. DAS steht für DQXVP, acidic (3-5 Aspartate und Glutamate) sowie STAES (*serine-rich*) (Lin *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 1996). Das DAS-Motif ist ebenfalls in AtCRY3 konserviert, doch besitzt AtCRY3 eine N-terminale Extension und keine C-terminale. CRY1 und CRY2 sind nukleäre Proteine (Kleiner *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000) und CRY3 wurde in Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen (Kleine *et al.*, 2003). Es wurde in diesen Arbeiten auch gezeigt, dass die C-terminalen Extensionen von CRY1 und CRY2 neben ihren Funktionen in der Signalweiterleitung auch für die subzelluläre Lokalisation zuständig ist.

Abgesehen von den DASH-Cryptochromen aus *Synechocystis sp.* und *Arabidopsis thaliana* konnte bisher nur die Kristallstruktur der PHR-Domäne von AtCRY1 gelöst werden (Brautigam *et al.*, 2004). Die Struktur der CRY1 PHR-Domäne ist ähnlich wie die der CPD-Photolyasen und ist unterteilt in zwei Sub-Domänen einer  $\alpha/\beta$ -Domäne und einer  $\alpha$ -helikalen Domäne, die den Chromophor FAD bindet. Die Tasche in der sich der FAD-Cofaktor



befindet, ist im Vergleich zu den Photolyasen jedoch größer und anstelle der Bindung eines Pyrimidin-Dimers, ist dieser Ort als ATP-Bindestelle für CRY1 identifiziert worden.

### Expression und Lokalisation

Die Transkription von CRY1 und CRY2 ist abhängig von der Photoperiode und der circadianen Uhr (Bognar *et al.*, 1999; El Assal *et al.*, 2003; Harmer *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2001) wobei die mRNA beider Cryptochrome lichtunabhängig in allen Organen der Pflanze exprimiert wird wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Übersicht in Lin und Shalitin, 2003). Die Maxima der Transkriptmengen der beiden Cryptochrome werden zu unterschiedlichen Tageszeiten erreicht. Während das Maximum an CRY1 mRNA am frühen Morgen erreicht ist, wird das Maximum für die CRY2 Transkriptmenge am späten Abend beobachtet. Die Amplitude dieser Expressionsschwankung ist jedoch nicht sehr ausgeprägt. Die Expression von CRY2 wird primär auf der Proteinebene reguliert. Im Gegensatz zu CRY1 wird CRY2 unter Blaulicht Bestrahlung schnell abgebaut (Lin *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 1998). Dieser Effekt ist abhängig von der Fluenzrate. Bei Bestrahlung mit Blaulicht mit einer Fluenzrate von  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  konnte nach 6 Stunden die gleiche Menge an CRY2 detektiert werden wie in der Dunkel Kontrolle. Nach 24 Stunden war immer noch eine gewisse Menge CRY2 vorhanden. Bei Erhöhung der Fluenzrate auf 20 bzw.  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ist die Menge an CRY2 bereits nach 1 Stunde sehr gering und nach 24 Stunde ist CRY2 komplett abgebaut. Unter UV-A Bestrahlung ist ebenfalls eine Abnahme zu beobachten. Hingegen hat Rot und Dunkelrot Bestrahlung auch bei hohen Fluenzrate keinen Effekt auf die Stabilität von CRY2. Diese Beobachtung, die in der *cry1* Mutante sowie im Wildtyp gemacht wurde, führte zu der Annahme, das CRY2 seine eigene Degradation steuert. Dies wird unterstützt durch den Befund, dass Blaulicht nicht die Neusynthese von CRY2 mRNA blockiert. Bei Behandlung von im Dunkeln angezogenen Keimlingen mit Cycloheximid, ein Inhibitor der Translation in Eukaryoten, konnte nach anschließender Blaulichtbestrahlung kein Unterschied in der CRY2 Menge beobachtet werden gegenüber unbehandelten Keimlingen (Ahmad *et al.*, 1998a). Um näher zu untersuchen, welche der beiden Domänen für die Degradation von CRY2 unter Blaulicht notwendig ist, wurden Experimente durchgeführt, in denen die verschiedenen Domänen von AtCRY1 und AtCRY2 ausgetauscht wurden. Diese chimären Gene wurden dann unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promoters in der *cry1* Mutante exprimiert (Ahmad *et al.*, 1998a). Die Fusionsproteine, die entweder die C-terminale Extensionsdomäne oder die N-terminale Domäne von CRY2 enthielten, waren biologisch aktiv und wiesen unter Blaulicht eine Reduktion der CRY2 Menge auf. Zwar zeigten ähnliche Domänen Austausch-Studien mit Fusionen an GFP oder GUS Reportern keine Lichtlabilität (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999), jedoch kann angenommen werden,

dass beide Domänen wichtig sind für die Degradation von CRY2 in einem funktionstüchtigen Cryptochrom Photorezeptor.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Protein Menge von CRY2 unter Kurztag Bedingungen stark und unter Langtag Bedingungen kaum oszilliert (Mockler *et al.*, 2003; El Assal *et al.*, 2001, 2003).

Ebenso wie bei der Degradation von phyA geht dem Abbau von CRY2 über das 26S Proteasom eine lichtabhängige Ubiquitinierung voraus, die im Fall von CRY2 im Kern erfolgt (Clough *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2007). CRY1 und CRY2 werden blaulichtabhängig phosphoryliert, was im Fall von CRY2 auch zum Abbau führt (Shalitin *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2007). Für CRY1 konnte gezeigt werden, dass eine nachfolgende Dunkelphase die Phosphorylierung wieder rückgängig macht (Shalitin *et al.*, 2003).

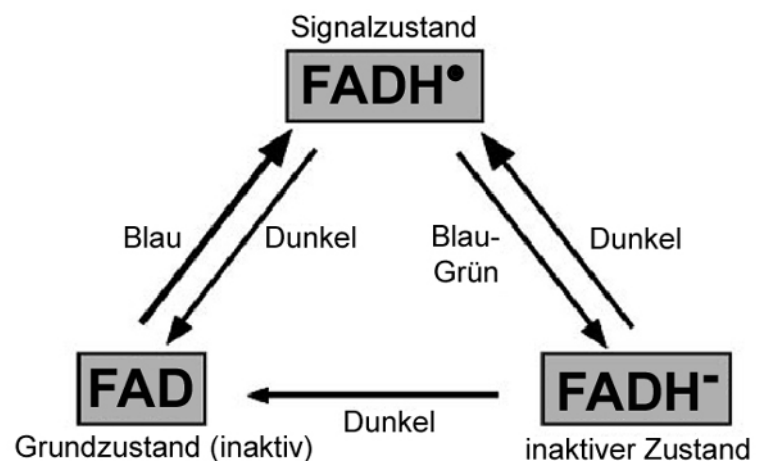
Lokalisationsstudien mit GFP- und GUS-Fusionen von CRY2 und Zellfraktionierungen zeigen, dass CRY2 unabhängig von den Lichtverhältnissen im Nukleus lokalisiert ist (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999). Es zeigte sich zudem, dass die GFP-Fusionen im Dunkeln gleichmäßig im Nukleus verteilt sind, es im Blaulicht jedoch zur Bildung von *nuclear speckles* oder *nuclear bodies* kommt, die im Fall von CRY2 mit phyB co-lokalisieren (Ma *et al.*, 2001). Hingegen ist CRY1 nur im Dunkeln im Nukleus lokalisiert, während es im Licht im Cytoplasma nachzuweisen ist (Yang *et al.*, 2000). Die Kernimport Sequenz liegt vermutlich in der PHR-Domäne, da Photolyasen auch im Nukleus lokalisiert sind, auch wenn die C-terminale Domäne von CRY2 ausreichend für den Import in den Nukleus ist (Guo *et al.*, 1999; Kleine *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Eine Kernlokalisationssequenz NLS (*nuclear localisation sequence*) konnte für CRY2 in der DAS-Domäne identifiziert werden, für CRY1 nicht. GFP-Fusionen mit dem C-Terminus von CRY2 sind zudem mit Chromatin assoziiert, wobei unklar ist, ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion mit DNA oder mit anderen DNA assoziierten Proteinen handelt (Cutler *et al.*, 2000; Lin und Shalitin, 2003).

### Signaltransduktion: Elektronentransfer, Phosphorylierung und Dimerisierung

Der Reaktionsmechanismus der Photolyasen nutzt lichtinduzierten Elektronentransfer vom vollständig reduzierten  $\text{FADH}^-$  auf das Substrat. Es wurde deshalb postuliert, dass Cryptochrome aufgrund der Ähnlichkeit in Sequenz und Chromophor Zusammensetzung diesen Mechanismus zur Signalweiterleitung nutzen (Malhotra *et al.*, 1995; Cashmore *et al.*, 1999). Nachfolgende Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die Photoreduktion des FAD in Cryptochromen zum semireduzierten  $\text{FADH}^0/\text{FAD}^{\cdot-}$  für deren Aktivität erforderlich ist dieser Prozess wie die Photoreduktion (Photoaktivierung) von Photolyasen verläuft. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Reduktion des Flavin Chromophors von CRY1 durch einen Elektronentransfer über 3 konservierte aromatische Aminosäuren für dessen *in*

*in vivo* Funktion von Bedeutung ist (Giovanni *et al.*, 2003; Zeugner *et al.*, 2005). Bei den Photolyasen ist diese Reaktion *in vivo* Funktion nicht essentiell (Kavakli und Sancar, 2004). Des Weiteren deuten Aktionsspektren von Cryptochrom-regulierten Prozessen darauf hin, dass im Gegensatz zu Photolyasen FAD im Grundzustand vollständig oxidiert vorliegt (Ahmad *et al.*, 2002). Weitere spektroskopische und physiologische Untersuchungen unterstützen die These, dass die Photoreduktion und der daraus resultierende Photozyklus biologische Relevanz hat (Bouly *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2007) (Abb.1.5). Ein weiterer Unterschied zu Photolyasen ist der Befund, dass bei Cryptochromen das neutrale Semichinon-FADH<sup>•</sup>-Radikal stabiler ist und als aktiver Signalzustand des Proteins fungiert. Das semireduzierte FADH<sup>•</sup> absorbiert anders als das vollständig reduzierte oder oxidierte Flavin Licht mit Wellenlängen über 500 nm wie Grünlicht. Grünlicht hat tatsächlich einen Einfluss auf das Gleichgewicht von den Flavin-Redox-Zuständen und reguliert somit auch Cryptochrom Antworten indem eine Abschwächung der Aktivität erfolgt. Nach Blaulichtbestrahlung wird die vorher im Dunkeln akkumulierte, inaktive oxidierte FAD-Form durch die Photoreduktion des Chromophors in die aktive semireduzierte FADH<sup>•</sup> Form umgewandelt. Es stellt sich ein Gleichgewicht der Redox-Zustände ein, wobei semireduziertes aktives FADH<sup>•</sup> überwiegt. Bei zusätzlicher Grünlichtbestrahlung wird dieses Verhältnis zugunsten der inaktiven vollständig reduzierten FADH<sup>-</sup> verschoben. Somit hat Grünlicht einen negativen Effekt auf die Cryptochrom Antworten, wie das Hypokotyllängenwachstum und die Anthocyanbildung (Bouly *et al.*, 2007) oder das Blühverhalten und die Degradation von CRY2 (Banerjee *et al.*, 2007).

Die Phosphorylierung ist, wie bei vielen Prozessen in der Regulation von Proteinen, auch entscheidend für die Aktivität und Stabilität von Cryptochromen. Es konnte gezeigt werden, dass Cryptochrome *in vivo* phosphoryliert werden und



**Abb. 1.5 Modell des Cryptochrom Photozyklus.** Abbildung aus Bouly *et al.*, (2007)

Aktivität sowie im Fall von cry2 auch Stabilität darüber reguliert werden. Erste Hinweise hierfür lieferten Studien, in denen im Dunkeln angezogenen Keimlinge und nachfolgende Inkubation mit radioaktivem Phosphat kein radioaktiv-markiertes CRY1 aufwiesen im Gegensatz zu Keimlingen, die mit Weißlicht bestrahlt worden waren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von CRY1 auch durch Rotlicht induziert wird und

dieser Prozess durch nachfolgende Dunkelrot-Bestrahlung reversibel ist unter Beteiligung von phyA (Ahmad *et al.*, 1998c). Eine direkte Interaktion vom C-Terminus von phyA mit dem C-Terminus von CRY1 konnte über *yeast-two-hybrid* Studien gezeigt werden.

Diese von phyA abhängige Phosphorylierung der Cryptochrome im Rotlicht zeigte sich im Blaulicht nicht. Grundsätzlich erfolgt eine rasche Phosphorylierung beider Cryptochrome nach Blaulichtbestrahlung innerhalb von 5-10 min. Jedoch scheint dies Phytochrom-unabhängig zu sein, da die Phosphorylierung der beiden Cryptochrome auch in *phyA*, *phyB* Einzel Mutanten sowie in der *phyA/phyB* Doppel Mutante, in Dreifach Mutanten (*phyA/phyB/phyD* und *-/phyE*) und in der *hy1* Mutante, die weitgehend defizient in der Biosynthese von Phytochromobilin ist, nachgewiesen werden konnte (Shalitin *et al.*, 2002, 2003). Dies und die Tatsache, dass die Ergebnisse der phyA-abhängigen Phosphorylierung von CRY1 im Rotlicht in Pflanzen nicht reproduziert werden konnte, führte zu der These, dass die Phosphorylierung der Cryptochrome durch einen Blaulicht Photorezeptor bzw. durch Autophosphorylierung reguliert ist. Die Phosphorylierung beider Cryptochrome ist unabhängig voneinander, da in Abwesenheit von CRY1 CRY2 phosphoryliert werden kann und umgekehrt (Shalitin *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung beider Cryptochrome ist ebenfalls fluenzratenabhängig, wobei CRY2 sensibler als CRY1 ist. Schon nach 15 min, bei einer Fluenzrate von  $5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ist CRY2 fast vollständig phosphoryliert während CRY1 kaum Phosphorylierung aufweist. Dies könnte auch die unterschiedlich biologische Aktivität beider Cryptochrome erklären, da CRY2 eher im Schwachlicht aktiv ist, während CRY1 unter hoher Lichtintensität höhere Aktivität zeigt. Für CRY1 konnte zu der Blaulicht-abhängigen Phosphorylierung zudem noch eine ATP-Abhängigkeit für die Autophosphorylierung *in vivo* nachgewiesen werden (Bouly *et al.*, 2003).

Die Expression der C-terminalen Domäne (CCT) von CRY2 oder CRY1 fusioniert mit GUS führte zu einem *cop* Phänotyp. Dieser ist gekennzeichnet durch ein kurzes Hypokotyl, erhöhter Anthocyan Synthese, Initiierung der Chloroplastenentwicklung und Expression von lichtinduzierten Genen bereits im Dunkeln. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu vollängen (*full-length*) CRY2 der C-Terminus unabhängig von Licht konstitutiv phosphoryliert ist (Yang *et al.*, 2000; Shalitin *et al.* 2002). Des Weiteren zeigt die Überexpression dieser Fusions-Proteine eine frühere Blühinduktion unter Kurztag Bedingungen als der Wildtyp.

Diese Ergebnisse und der Befunde, dass es bei Mutationen im C-Terminus von CRY1 zu einem vollständigen Verlust der Photorezeptoraktivität kommt, haben zu einem Modell geführt, indem der C-Terminus der Cryptochrome die Signalweiterleitung reguliert. Es wird angenommen, dass im intakten Photorezeptor die C-terminale Signal-Domäne von der sensorischen N-terminalen PHR-Domäne im Dunkeln inhibiert wird. Nach Lichtanregung erfolgt durch Elektronentransfer bzw. über Änderung des Redoxzustandes des FAD Chromophors im N-terminalen Bereich eine strukturelle Konformationsänderung im C-

Terminus, einhergehend mit dessen Phosphorylierung (Lin und Todo, 2005), was die Weiterleitung des Signals zu nachfolgenden (*downstream*) Partnern ermöglicht (Partch *et al.*, 2005; Kottke *et al.*, 2006). Ein weiterer Aspekt in der Regulierung der Signalweiterleitung von Cryptochromen ist die für die vollständige Funktion beschriebene notwendige Dimerisierung dieser Photorezeptoren. Sowohl für CRY1 (Sang *et al.*, 2005) sowie für CRY2 (Rosenfeldt *et al.*, 2008) konnte eine Homodimerisierung der Proteine *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Somit ist auch ein direkter Phosphattransfer vom N-Terminus des einen Cryptochrom Moleküls zum C-Terminus des anderen Cryptochrom Moleküls innerhalb eines Dimers denkbar. Dabei vermittelt die N-terminale Domäne die für die Signalweiterleitung notwendige Dimerisierung (Sang *et al.*, 2005; Shalitin *et al.*, 2003). Eine chemisch induzierbare und dadurch lichtunabhängige Dimerisierung der C-terminalen Domäne *in vivo* bestätigte, dass allein die Dimerisierung der C-terminalen Domäne für die effektive Signalweiterleitung und Vermittlung der blaulichtinduzierten Cryptochrom Antwort ausreichend ist (Rosenfeldt *et al.*, 2008).

Inwieweit eine Phosphorylierungsreaktion bzw. eine Konformationsänderung des Proteins durch den Signalzustand des semireduzierten FADH° ausgelöst wird und ob *in vivo* ein Äquilibrium von monomerer- und oligomerer-Form der Cryptochrome die Aktivität dieser beeinflusst und reguliert, bedarf noch weiterer Klärung.

Eine zusätzliche Form der Regulation der Signaltransduktion wurde von Burney *et al.*, (2009) beschrieben. ATP kann durch seine Bindung an CRY1 unabhängig von Licht und Autophosphorylierung eine Konformationsänderung auslösen und die Stabilität vom lichtinduzierten Flavin-Radikal erhöhen. Somit könnte ATP-Bindung ebenfalls eine Form der Regulation auch im Dunkeln der biologischen Aktivität für CRY1 sein.

### Signalweiterleitung und biologische Funktion

Die Signalweiterleitung der Cryptochrome basiert auf einer durch den C-Terminus vermittelten lichtunabhängigen Interaktion mit anderen Proteinen. Dies wurde einerseits durch die Beobachtung bestätigt, dass die Expression von GUS-CCT Fusionsproteinen (Yang *et al.*, 2000) einen *cop* Phänotyp hervorrief (Deng *et al.*, 1992). Andererseits ist die beobachtete Interaktion des C-Terminus von CRY1 und CRY2 mit COP1, einem Repressor der Photomorphogenese (siehe auch 1.5.1), lichtunabhängig (Yang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

COP1 fungiert als E3 Ligase und führt Transkriptionsfaktoren wie HY5 der proteasomalen Degradation zu. Die Interaktion von COP1 mit beiden Cryptochromen erfolgt über die C-terminale WD-40 Domäne des Repressors. Notwendig für die Interaktion ist die Dimerisierung der beiden C-terminalen Domänen.

Nach dem Modell von Partch *et al.* (2005) führt eine blaulichtabhängige Konformationsänderung des C-Terminus von Cryptochrom dazu, dass die vorher bestehende Interaktion von COP1 mit HY5 verhindert bzw. unterdrückt wird. Dadurch wird die im Dunkeln ablaufende und COP1-vermittelte Degradation von HY5 unterbrochen, HY5 akkumuliert und löst somit eine vermehrte Induktion der Transkription verschiedener lichtregulierter Gene aus. Ob die Transduktion des Lichtsignals über die sensorische Cryptochrom Domäne notwendig ist, um eine Inhibierung und/oder eine Translokalisierung von COP1 auszulösen, ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die Überexpression von CCT bereits ohne sensorische Domäne biologisch aktiv ist und COP1 reprimiert (Yang *et al.*, 2001). Es besteht auch die Möglichkeit, dass COP1 mit HY5 und der CCT Domäne simultan bereits im Dunkeln bindet und nach Lichteinfall CCT mit HY5 um die Bindung zu COP1 konkurriert.

Neben der Interaktion mit COP1 wurden Interaktionen von Cryptochromen mit verschiedenen anderen Photorezeptoren nachgewiesen. So interagiert CRY1 mit phyA (Ahmad *et al.*, 1998b) und ZTL (Jarillo *et al.*, 2001) gezeigt in *yeast-two-hybrid* Studien, während CRY2 mit phyB lichtabhängig interagiert (Mas *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte mit der Signalkomponente AtPP7, eine Ser/Thr-Protein Phosphatase, ein positiver Regulator der Cryptochrom vermittelten Blaulicht Antwort identifiziert werden. Ein Substrat für AtPP7 konnte aber noch nicht gefunden werden (Moller *et al.*, 2003). Eine weitere indirekte Signalkomponente von Cryptochrom ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein SUB1. Bei Blaulicht und Rotlicht Bestrahlung weisen *sub1* Mutanten einen hypersensitiven Phänotyp auf, der auf einen Einfluss in der Regulation der Signaltransduktion von phyA und Cryptochrom schließen lässt (Guo *et al.*, 2001). SUB1 ist somit eine weitere positive Komponente der Verarbeitung des von CRY1 und phyA übermittelten Lichtsignals. Die *hfr1* Mutante zeigt unter Dauer Blaulichtbestrahlung mit hoher Fluenzrate eine reduzierte Deetiolierungs-Antwort (Duek und Fankhauser, 2003). HFR1 wird ebenfalls auf Proteinebene über COP1 durch proteasomalen Abbau reguliert. Zudem ist HFR1 ein wichtiger Faktor in der CRY1 vermittelten Genexpression (Yang *et al.*, 2005; Duek *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008).

Eine Blaulicht-spezifische Interaktion konnte zwischen *cry2* und CIB1 (*cryptochrom interacting basic-helix-loop-helix 1*) gezeigt werden (Liu *et al.*, 2008). Durch *yeast-two-hybrid* Studien und Co-Immunopräzipitations-Analysen konnte die Interaktion blaulichtabhängig nachgewiesen werden. In *Arabidopsis thaliana* fördert CIB1 die Blühinduktion mittels direkter Stimulation der mRNA-Expression von *FT*. Ein zweiter Weg zur Aktivierung der FT Synthese durch Cryptochrome ist die Inhibierung von COP1. Diese führt zu der Akkumulation des Transkriptionsfaktors CO (CONSTANS) der wiederum die Expression von *FT* positiv reguliert (Valverde *et al.*, 2004).

Wie schon erwähnt ist der hauptsächliche Wirkungsort der Cryptochrome der Zellkern. Im Gegensatz zu CRY2 konnte CRY1 auch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Wu und Spalding (2007) haben mit Hilfe von artifiziell *targeting* in den Nukleus bzw. ins Cytoplasma die verschiedenen Antworten von CRY1 hinsichtlich der Wirkungsstätte untersucht. Während die Anthocyan-Akkumulation und das Hypokotyl- sowie das Petiolenwachstum durch nukleäres CRY1 reguliert werden, wird die Kotyledonenexpansion von cytoplasmatischem CRY1 gesteuert. Nukleäres CRY1 scheint bei hohen Fluenzraten das Wurzelwachstum negativ zu beeinflussen, cytoplasmatisches CRY1 wirkt dagegen positiv auf dieses.

Erste Hinweise für die Bedeutung der Cryptochrome in der Photomorphogenese lieferte ein *screen* von Mutanten in dem das *CRY1* Gen identifiziert worden ist. Diese Mutanten wiesen im Licht ein langes Hypokotyl auf (Ahmad und Cashmore, 1993).

Nachfolgende Untersuchungen mit der *CRY1* Mutante ergaben eine Reduzierung verschiedener Prozesse, die an der Photomorphogenese beteiligt sind. So zeigte die Mutante Defizite in der De-etiolierung unter Blau- und Weißlicht und eine reduzierte Anthocyan Synthese. CRY1 hat Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene die durch Blaulicht reguliert werden (Ma *et al.*, 2001). So wird das Gen der Chalkonsynthase, dem ersten Enzym der Flavonoid- und Anthocyanbiosynthese (Ahmad *et al.*, 1995; Jackson und Jenkins 1995), von CRY1 blaulichtabhängig reguliert. Aus der Überexpression von CRY1 resultiert eine erhöhte Sensitivität in Prozessen der Deetiolierung, was konsistent ist mit den vorher beschriebenen Wirkungen von CRY1 (Lin *et al.*, 1995b, 1996a, 1998). CRY1 und CRY2 wirken in diesem Prozess redundant, was Untersuchungen an *cry1/cry2* Doppelmutanten zeigten (Ahmad *et al.*, 1998c; Mockler *et al.*, 1999; Mazella *et al.*, 2001b). Die Wachstumshemmung des Hypokotyls im Blaulicht wird in der ersten kurzen Phase durch PHOT1 vermittelt, in der zweiten längeren Phase wird dies vorrangig durch CRY1 vermittelt und nicht durch das lichtlabile CRY2 (Folta und Spalding, 2001; Parks *et al.*, 2001). In der Regulation des Phototropismus wurde ein weiteres Zusammenspiel von Phototropinen und Cryptochromen beobachtet. Hierbei wurde ein additiver Effekt für Cryptochrom in der phototropen Hypokotylkrümmung sowie in der lichtinduzierten Bewegung der Schließzellen der Stomata festgestellt (Mao *et al.*, 2005; Ohgishi *et al.*, 2004). Eine antagonistische Wirkungsweise von CRY1 und CRY2 konnte in der Wurzelelongation festgestellt werden. Dieser Effekt ist bedingt durch den Einfluss der Cryptochrome am Auxin-Transport und der – Signalleitung (Canamero *et al.*, 2006). Des Weiteren sind die Cryptochrome neben den Phototropinen und Phytochromen an der Öffnung des Hypokotylhakens und der Expansion der Kotyledonen beteiligt (Lin *et al.*, 1998; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2010).

In der Blühinduktion und bei der Steuerung der circadianen Rhythmik spielt Cryptochrom zusammen mit Phytochrom eine wesentliche Rolle und hat Einfluss auf die Innere Uhr. Bei

der Synchronisierung der Inneren Uhr ist CRY1 der dominante Blaulicht Photorezeptor. Die Analyse von *cry1/cry2* Doppelmutanten zeigte, dass CRY2 hierbei eine redundante Funktion zu CRY1 und aufgrund seiner Lichtlabilität nur unter schwachem Licht einen Einfluss hat (Somers *et al.*, 1999; Devlin und Kay, 2000). Ein Hinweis für die Beteiligung der Cryptochrome an den Phytochrom-Signalwegen ist der Befund, dass die Periodenlänge in der *cry1/cry2* Doppelmutante unter schwachem Rotlicht verändert ist (Devlin und Kay, 2000). Weitere Argumente für ein direktes Zusammenwirken von Phytochromen und Cryptochromen sind die bereits erwähnte direkte physikalische Interaktion von Phytochromen und Cryptochromen (Ahmad *et al.*, 1998b; Mas *et al.*, 2000), die phyA-abhängige Phosphorylierung von CRY1 (Ahmad *et al.*, 1998b) und die Einordnung von CRY1 unterhalb von phyA durch Epistasi-Studien (Devlin und Kay, 2000).

Die Adaptation von Pflanzen an die Jahreszeit ist genauso wie die tägliche Anpassung der circadianen Rhythmik über das photosensorische System gesteuert (Searle und Coupland, 2004). Die photoperiodische Blühinduktion zeigt für Langtagpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* eine frühe Blühinduktion unter Langtag Bedingungen im Gegensatz zu Kurztag Bedingungen. Mit Hilfe der *pha-1* Mutante (Koornneef *et al.*, 1991), die unter Langtag spät blüht und allelisch zum CRY2 Gen ist (Guo *et al.*, 1998), konnte der Einfluss von CRY2 auf die Blühinduktion bestätigt werden. Hierbei ist CRY2 auf drei unterschiedlichen Ebenen beteiligt (s.o.).

Die Funktion von CRY1 in der Blühinduktion ist gegenüber CRY2 redundant (Bagnall *et al.*, 1996) bzw. hat möglicherweise gar keinen Einfluss darauf (Zagotta *et al.*, 1996; Mockler *et al.*, 1999).

## 1.4 Repression der Photomorphogenese

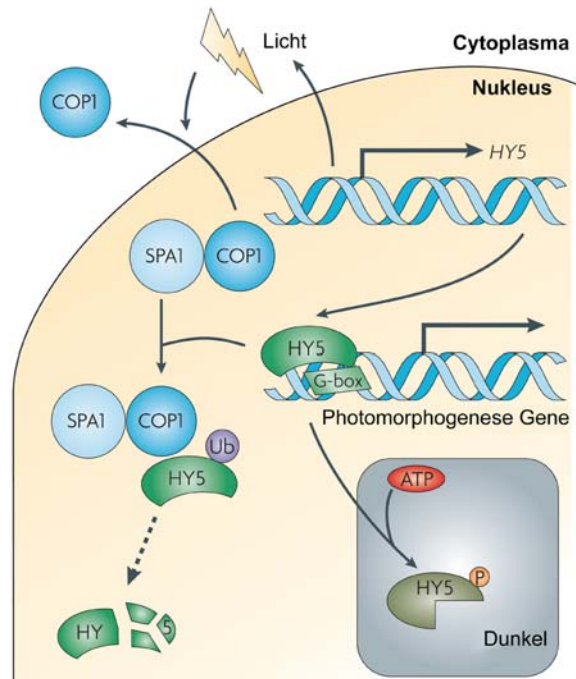
### 1.4.1 COP1: ein Repressor der Photomorphogenese

Für die Identifikation von Signalkomponenten in der Signaltransduktion der Photomorphogenese in *Arabidopsis thaliana* wurde unter anderem ein Screen nach Mutanten durchgeführt, die im Dunkeln bereits einen lichtgewachsenen Phänotyp aufwiesen. Hierbei wurden mehrere Gene identifiziert, die an der Photomorphogenese als Repressor beteiligt sind. Eines dieser Gene ist *COP1* (*constitutively photomorphogenic 1*). (Deng *et al.*, 1991). Typische Merkmale von *cop* Mutanten sind ein kurzes Hypokotyl, geöffnete Kotyledonen und die Akkumulation von Anthocyan im Dunkeln. Neben der genetischen Analyse der Mutanten mit Funktionsverlust, zeigte die Überexpression des Proteins COP1, dass die Konzentration in unterschiedlichen transgenen Linien von *Arabidopsis thaliana* mit dem Grad der Inhibierung der Photomorphogenese im Licht korreliert (Mc Nellis *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass COP1 eine inhibitorische Funktion in



der Regulation der Photomorphogenese hat. Neben der Deetiolierung von Keimlingen hat COP1 auch in adulten Pflanzen eine Funktion. So wurde z.B. gezeigt, dass *cop1* Mutanten unabhängig von den Lichtbedingungen die Schließzellen der Stomata geöffnet halten. Die Bewegung der Schließzellen wird somit auch über COP1 reguliert (Mao *et al.*, 2005). COP1 besteht aus drei strukturell und funktionell unterschiedlichen Domänen. Der N-Terminus besteht aus einem Zinkfinger Motif (*zinc binding motif* oder *Ring-finger*) gefolgt von einer NES (*nuclear export signal*) Lokalisationssequenz und einer *coil-coil* Region. Im C-terminalen Bereich besitzt COP1 nach einer NIS (*nuclear import signal*) einen sog. *WD-40 Repeat*, der für die Funktion des Proteins unerlässlich ist und die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. Die Expression des N-Terminus von COP1 ohne die C-terminale *WD-40 Repeat* Domäne

führt zu einem dominant negativen Phänotyp, ähnlich der *cop1* Mutante und zur Hypersensitivität gegenüber Rot-/Dunkelrotlicht und Blaulicht (Mc Nellis *et al.*, 1996). Zum anfänglichen Verständnis des molekularen Mechanismus von COP1 als Repressor der Photomorphogenese trug die Identifizierung verschiedener Interaktionspartner bei. Durch *in vitro* und *in vivo* Studien konnte eine direkte Interaktion mit HY5 (*Elongated Hypokotyl in Light 5*), einem bZIP Transkriptionsfaktor für die Photomorphogenese, nachgewiesen werden (Ang *et al.*, 1998). Dieser wird durch COP1 vermittelt über das 26S Proteasom im Dunkeln degradiert (Abb.1.6). Des Weiteren wurde CIP7 (*COP1 interacting protein 7*), ein im Nukleus lokalisiertes Protein, als Interaktionspartner identifiziert (Yoshiharu *et al.*, 1998), sowie CIP1, CIP4, STO und STH (Holm *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 1998, 2001; Matsui *et al.*, 1995). Ein weiterer Interaktionspartner ist CIP8, ein kleines Protein mit einem *Ring-finger* Motiv, welches an das ring-finger Motiv von COP1 bindet (Torii *et al.*, 1999; Hartdke *et al.*, 2002). Ferner wurde gezeigt, dass COP1 im Dunkeln im Nukleus lokalisiert ist und im Licht in das Cytoplasma transportiert wird (von Arnim *et al.*, 1994; Holm and Deng, 1999; Stacey *et al.*, 2000). In HY5 defizienten Pflanzen ist COP1 konstitutiv im Nukleus lokalisiert (Osterlund *et*



**Abb. 1.6 Übersicht über die lichtabhängige Regulation des Transkriptionsfaktors HY5 durch COP1.** Die Menge an HY5 ist auf der Transkriptions-Ebene lichtabhängig reguliert. Zusätzlich wird durch nukleares COP1 HY5 über Ubiquitinierung der proteasomalen Degradation zugeführt. Dabei wird vorzugsweise die COP1-binde Domäne von HY5 im Dunkeln phosphoryliert. Unphosphoryliertes HY5 besitzt eine höhere Affinität zu dessen Ziel Promotoren, bindet stärker COP1 und ist zudem das bevorzugte Substrat für die Degradation. Abbildung aus Jiao *et al.*, (2007)

*al.*, 2000). Die Aktivität von COP1 ist von dessen subzellulärer Lokalisation abhängig. So ist COP1 im Nukleus aktiv, während es im Cytoplasma abgebaut wird (Subramanian *et al.*, 2004). Somit fungiert COP1 als Repressor der Photomorphogenese indem es positive Regulatoren der Photomorphogenese (z.B. HY5) im Dunkeln der proteasomalen Degradation zuführt (Osterlund *et al.* 2000; Holm *et al.* 2001). Später konnte gezeigt werden, dass COP1 als E3 Ubiquitin-Ligase fungiert und zusammen mit dem COP9 Signalosom und mit COP10 interagiert (Suzuki *et al.*, 2002). In *Arabidopsis thaliana* bilden COP10, DET1 und DBB1 einen stabilen Proteinkomplex, den sog. CDD Komplex. Es zeigte sich, dass COP10 mit der E2-Ligase, der COP1 *Ring-finger* Domäne und dem COP9 Signalosom interagiert. Dabei wird nach Übertragung einzelner Ubiquitin Moleküle auf den Transkriptionsfaktor HY5 durch E1, E2 und COP1 als E3 Ligase dieser über das 26S Proteasom abgebaut.

Weitere Transkriptionsfaktoren wie HFR1, ein bHLH Transkriptionsfaktor, LAF1, ein myb Transkriptionsfaktor, und HYH konnten als Interaktionspartner von COP1 identifiziert werden. Eine Übersicht darüber findet sich im Review von Yi und Deng (2005).

Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion von COP1 mit den lichtlabilen Photorezeptoren Phytochrom A (phyA) und Cryptochrom 2 (CRY2) nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2003; Shalitin *et al.*, 2002). Der Einfluss von COP1 auf die Stabilität der beiden Photorezeptoren lässt auf eine Möglichkeit der „Feinjustierung“ in der Lichtsignal-Regulation schließen. phyA und CRY2 werden durch diese Interaktion polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut, was eine Akkumulation beider Photorezeptoren bzw. eine Verstärkung der Licht Signaltransduktion verhindert. Bei der Interaktion von COP1 mit lichtstabileren Photorezeptoren wie phyB und CRY1 konnte hingegen kein Effekt auf die Stabilität dieser Photorezeptoren beobachtet werden (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Unter anderem zeigten *Yeast-two-hybrid* Analysen, dass die Interaktion von CRY1 und CRY2 mit COP1 deren C-Terminus vermittelt wird. Die Interaktion ist licht-unabhängig, was auf einen zusätzlichen lichtabhängigen Prozess in den Cryptochromen schließen lässt, der dann zur Inaktivierung von COP1 führt (Yang *et al.*, 2001; Sang *et al.*, 2005). Die aus der Interaktion von COP1 mit den verschiedenen Photorezeptoren resultierende Inaktivierung von COP1 führt zur Akkumulation verschiedenster Transkriptionsfaktoren wie z.B. HY5 und HFR1 und nachfolgender Aktivierung entsprechender Zielgene.

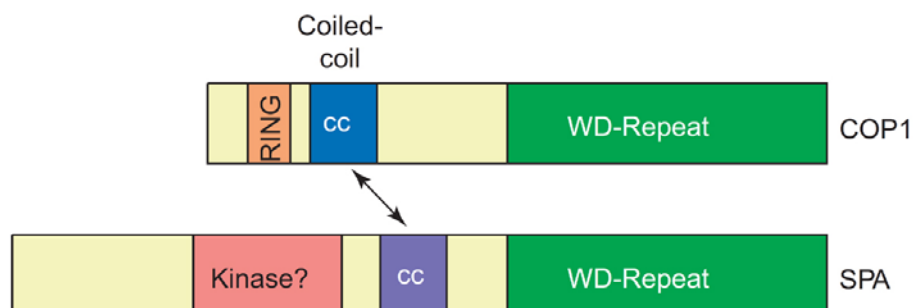
COP1 fungiert somit als zentraler Schalter beim Übergang von der Skoto- zur Photomorphogenese und es ergibt sich folgendes Modell: Nach Lichtanregung der entsprechenden Photorezeptoren werden verschiedene und sich teilweise überlappende Signalwege aktiviert, die die Photomorphogenese durch Akkumulation verschiedener Transkriptionsfaktoren einleiten. COP1 reprimiert die photomorphogenetische Entwicklung bei Abwesenheit von Licht, indem es die positiv wirkenden Transkriptionsfaktoren ubiquitiniert und so für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Bei Anwesenheit von

Licht wird COP1 von Photorezeptoren wie phyA, CRY1 und CRY2 inhibiert und die Aktivität der einzelnen Transkriptionsfaktoren ist somit gewährleistet.

Aufgrund der Komplexität der Signaltransduktion der Photomorphogenese und der Funktion von COP1 konnte hier nicht im Einzelnen auf alle bisher bekannten Interaktionspartner eingegangen werden. Für die Interaktion mit der Familie der SPA Proteine (*suppressor of phytochrom A*) und der genaueren Beschreibung der Interaktion mit CRY1 und CRY2 wird auf das nachfolgende Kapitel bzw. auf Kapitel 1.3.3.1 verwiesen.

### 1.4.2 SPA Protein Familie

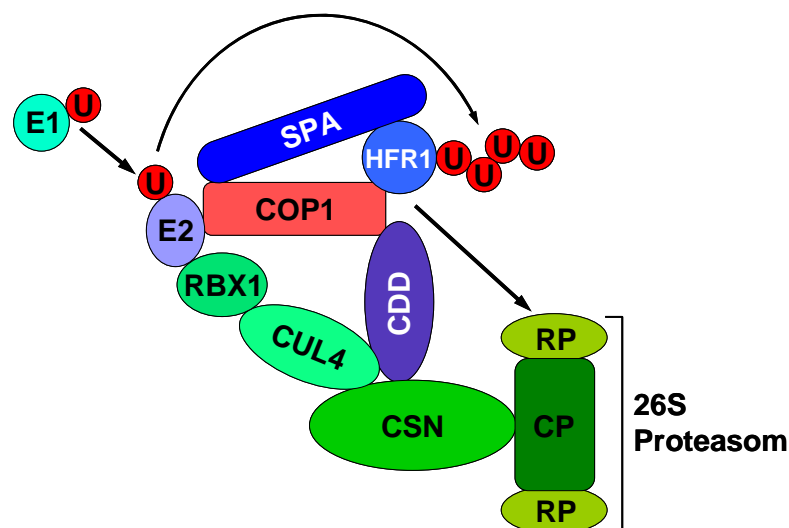
Die SPA Proteine, die nicht direkt der COP/DET/FUS Protein Klasse angehören, besitzen eine hohe Ähnlichkeit zu COP1 hinsichtlich ihres Domänenaufbaus sowie in ihrer Funktion bzw. Bedeutung in der Signaltransduktion der Photomorphogenese. Das *spa1* (*suppressor of phyA-105 1*) Gen wurde in einem Mutanten *screen* identifiziert, indem nach einen Repressor des schwachen *phyA* (*phyA-105*) Allels gesucht wurde, der möglicherweise als negativer Regulator der *phyA* vermittelten Dunkelrot Antwort fungiert (Hoecker *et al.*, 1998). Das Gen von *SPA1* codiert für ein Protein das in drei unterschiedliche Domänen unterteilt werden kann. N-terminal liegt eine Kinase-Domäne, gefolgt von einer *coiled-coil* Domäne und einer C-terminalen *WD-40* Domäne ähnlich der von COP1 (Hoecker *et al.*, 1999) (Abb.1.7). Diese *WD-40* Domäne ist ebenfalls wie bei COP1 essentiell für die Aktivität von SPA1 und besitzt hohe Sequenzhomologie zu COP1 mit einer 44%igen Ähnlichkeit in der Aminosäuren Sequenz. SPA1 bindet wie COP1 auch (Saijo *et al.*, 2003) über die *WD-40* Domäne HY5. Eine Interaktion zwischen SPA1 und COP1 wird über die *coiled-coil* Domäne vermittelt (Hoecker und Quail 2001; Saijo *et al.*, 2003). Funktionelle Analysen zeigten zudem, dass SPA1 synergistisch mit COP1 die Proteinkonzentration von HY5 reguliert bzw. auf die Degradation des Transkriptionsfaktors Einfluss hat. So ist SPA1 in der Lage, *in vitro* die E3 Ligaseaktivität von COP1 zu regulieren. Vollängen SPA1 inhibiert die E3 Ligase Aktivität von COP1 gegenüber HY5, während die *coiled-coil* Domäne die Ubiquitinierung von LAF1 durch



**Abb. 1.7 Vergleich der Domänen Struktur von COP1 und der SPA Protein Familie.** COP1 besteht aus dem N-terminalen *ring finger motif*, gefolgt von der *coiled-coil* Domäne und dem C-terminalen *WD40-Repeat*. Im Unterschied dazu besitzen die SPA Proteine N-terminal eine Kinase-ähnliche Domäne, gefolgt von einer *coiled-coil* Domäne und einer C-terminalen *WD40-Repeat* Domäne ähnlich zu COP1. Die Pfeile markieren den Bereich der Domänen über die die Interaktion beider vermittelt wird. Abbildung aus Hoecker (2005).

COP1 fördert (Saijo *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003). Dieser augenscheinliche Widerspruch zwischen diesen Befunden resultiert vermutlich aus der Verwendung unterschiedlicher E2 Untereinheiten sowie aus dem Gebrauch verschiedener Substrate in den *in vitro* Assays. Eine zweite Erklärung wäre die Verwendung von SPA1 im Überschuss. So könnte das volllängen SPA1 Protein in der Lage sein, HY5 von COP1 zu verdrängen und eine verkürzte Version von SPA1, nur mit der *coiled-coil* Domäne ohne die *WD-40* Domäne, ist dazu nicht in der Lage. Trotz dieser noch nicht geklärten Fragen kann angenommen werden, dass SPA1 ein negativer Regulator der HY5 Protein Akkumulation unter Dunkelrotlicht ist (Saijo *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass ein Heteroproteinkomplex bestehend aus COP1 und SPA1, Zielproteine wie HY5, HFR1 oder LAF1 über ihre *WD-40* Domänen bindet und diese Substrate der Ubiquitinierung und nachfolgender proteasomaler Degradation zuführt.

In *Arabidopsis thaliana* konnten drei weitere Homologe zu SPA1 identifiziert werden, namentlich SPA2, SPA3 und SPA4 (Laubinger und Hoecker 2003; Laubinger *et al.*, 2004). Der Verlust aller *SPA* Gene in der vierfach Mutante *spa1/spa2/spa3/spa4* führt zu einer ausgeprägten konstitutiven Photomorphogenese ähnlich dem *cop* Phänotyp unabhängig davon, ob die Mutante im Dunkeln oder im Licht angezogen wird. Diese Vierfach Mutante ist wesentlich kleiner als die Wildtyp Pflanze, produziert aber Blüten und einige Samen. Die Einzelmutanten *spa1*, *spa2* und *spa3* zeigen zudem eine erhöhte Lichtsensivität.



**Abb. 1.8 Modell der Degradation des Transkriptionsfaktors HFR1 über das 26S Proteasom durch den Cullin-4 E3 Ligase Komplex.** Ähnlich wie in Säugetieren reguliert dieser E3 Ligase Komplex In *Arabidopsis thaliana* verschiedene Entwicklungsprozesse und ist zudem essentiell für die Repression der Photomorphogenese (Wertz *et al.*, 2004; Bernhardt *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006). Er besteht aus den Proteinen DET1, COP10, DDB1 (zusammen CDD-Komplex), CUL4 und RBX1 und den Proteinen COP1, der funktionellen E3 Ligase, den SPA Proteinen sowie dem COP9 Signalosom (CSN). HRF1 ist das Substratprotein, das der proteasomalen Degradation nach Ubiquitinierung zugeführt wird. U: Ubiquitin; RP: regulatorisches Element des 26S Proteasoms; CP: katalytischer Teil des 26S Proteasoms. Abbildung nach Lin und Wang (2007).

Genetische Analysen lassen auf spezifische und überlappende Funktionen der einzelnen SPA Proteine in der Regulation der lichtabhängigen Entwicklung schließen und es scheint, dass alle eine Funktion als Repressor der Photomorphogenese haben (Laubinger *et al.*, 2004).

So sind SPA1 und SPA2 dominant in der Regulation des Wachstums der Keimlinge, während SPA3 und SPA4 eine wichtige Rolle in der Vermeidung von Zwergwuchs bei adulten Pflanzen übernehmen. SPA1 hat zudem noch eine wichtige Funktion in der Regulation der Blühinduktion. Weiterhin sind die SPA Proteine notwendig für die Inhibition der Blühinduktion unter Kurztag Bedingungen indem die SPA Proteine einen negativen Einfluss auf die Stabilität von CONSTANS haben (Übersicht in Hoecker *et al.*, 2005).

Die Proteine SPA2, SPA3 und SPA4 interagieren wie SPA1 mit COP1. Dies lässt vermuten, dass die Funktion von COP1 durch alle vier SPA Proteine mit unterschiedlichem Einfluss reguliert wird (Laubinger und Hoecker 2003; Laubinger *et al.*, 2004). Ein weiteres Argument für die wichtige Rolle von SPA1 in der Regulation der Photomorphogenese ist der durch genetische Analysen gezeigte Befund, dass SPA1 mit DET1, einem Bestandteil des CDD Komplexes, interagieren kann und somit die Stabilität von Zielproteinen des COP1/SPA-Komplexes beeinflusst (Nixdorf und Hoecker 2009) (Abb.1.8).

## 2. Zielsetzung

Die biochemische und spektroskopische Charakterisierung des pflanzlichen Photorezeptors Cryptochrom 2 (CRY2) aus *Arabidopsis thaliana* gestaltet sich aufgrund seines schnellen Abbaus nach Blaulichtbestrahlung *in vivo* als schwierig. Die flexible C-terminalen Domäne erschwert die Kristallisation von CRY2 und somit eine strukturbasierte Analyse des Proteins. Weiterhin wird die Charakterisierung der *in vivo* Funktion von CRY2 aufgrund der teilweisen Redundanz in der biologischen Funktion mit Cryptochrom 1 (CRY1) beeinträchtigt (Ahmad *et al.*, 1998c; Mockler *et al.*, 1999; Mazella *et al.*, 2001b; Mao *et al.*, 2005; Ohgishi *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1998; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2010).

In Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Aspekte im Zusammenhang mit der biologischen Funktion und der Stabilität von CRY2 *in vitro* und *in vivo* näher untersucht werden. Hierzu zählten ein möglicher Einfluss der Dimerisierung von CRY2 auf die Interaktion mit COP1 (*CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1*) über die C-terminale Domäne von CRY2 (CCT2) (Yang *et al.*, 2000, 2001; Wang *et al.*, 2001; Partch *et al.*, 2005). Weiterhin sollten rekombinante Proteine von CCT2 und COP1 in ausreichender Menge und Reinheit für strukturbiochemische Analysen hergestellt werden.

Über *in vitro* Co-Immunopräzipitations-Studien sollte untersucht werden, ob eine direkte Interaktion von CRY2 mit Proteinen der SPA (*SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A*)-Familie (SPA1-4) nachzuweisen ist. SPA-Proteine sind Komponenten des Phytochrom A Signalweges, besitzen hohe Ähnlichkeit in ihrem Domänenaufbau zu COP1 und interagieren direkt mit COP1 (Hoecker und Quail 2001; Saijo *et al.*, 2003; Laubinger und Hoecker 2003; Laubinger *et al.*, 2004). Da eine Interaktion von CCT2 und COP1 über *Yeast-Two-Hybrid* Studien bereits gezeigt werden konnte, sind die SPA Proteine aufgrund einer ähnlichen Domänenstruktur möglicherweise auch in der Lage mit CRY2 direkt zu interagieren.

Zusätzlich zu den *in vitro* Studien sollte über *in vivo* Experimente eine mögliche Beteiligung der SPA Proteine und des Photorezeptors Phytochrom A am Abbau von CRY2 bzw. deren Einfluss auf die Stabilität von CRY2 untersucht werden. Für diese Arbeiten sollten quantitative *Western-Blot* Analysen durchgeführt werden.

Ein möglicher Einfluss von SPA-Proteinen auf die Phosphorylierung von CRY2 (Ahmad *et al.*, 1998c; Shalitin *et al.*, 2002, 2003; Yang *et al.*, 2000) war ein weiterer Aspekt der geplanten Arbeiten, ebenso die Frage, ob die in dieser Arbeit genutzten Ökotypen sich in ihrer CRY2 Proteinmenge unter Langtag- und Kurztag-Bedingungen unterscheiden.

### 3. Material & Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Herstellern Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und Applichem (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Chemikalien entsprachen alle dem geforderten Reinheitsgrad zur Analyse (p.A.).

##### 3.1.2 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Äkta Purifier		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Blotapparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotapparatur	Wet Blot Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Digitalkamera	Coolpix 5000	Nikon, Tokio, Japan
Folienschweißgerät	Vakupak	Krupps
French Press	French <sup>®</sup> Pressure Cell Press	SLM AMINCO/Spectronic
Geltrocknungs Apparatur	Gel Slap Drier GSD4	Pharmacia
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Infrarotscanner	Odyssey <sup>®</sup> Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Lichtkammern	Floral LEDs ControlMaster Jr	Plant Climatics CLF, Wertingen
Lichtschränke	Reach-in plant growth chambers	Percival Scientific
Magnetrührer	RTC basic	Heidolph, Schwabach
Optometer	P-2000 Optometer	Gigahertz-Optik, Puchheim
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	CG825 ph-Meter	Schott, Wiesbaden
Photometer	UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer	Shimadzu, Kyoto, Japan
Photometer	UV-1202, UV-VIS Spectrophotometer	Shimadzu, Kyoto, Japan
Photometer	GeneQuant 1300	GE Healthcare, München
Photometer	Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Pipettensatz	eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Einmal Pipetten	Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH; Fernwald
Radioaktiv Scanner	Phosphorimager <sup>TM</sup> SI System	Molecular Dynamics, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Geräte	Bezeichnung	Firma
Radioaktiv Kassette	Storage Phosphor Screen	GE Healthcare, München
Scanner	Optic Pro 9656T	Plustek Technology GmbH, Ahrensburg
Schüttler	Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
SDS- Gelelektrophorese-Apparatur	Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Spannungs-/Stromquelle (Netzgeräte)	Power 300 Electrophoresis Power Supply	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Sterilbank	Aura H 130	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen
Sterilbank	Hera safe KS 2	Thermo Scientific
Sterilbank	Faster KBN	SAROSSY Labortechnik, Reutlingen
Tischschüttler		Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Ultraschallgerät	Sonicator	MSE (Measuring & Scientific Equipment), London, UK
Ultraschallbad	Sonorex TK52	Bandelin electronic, Berlin
Vortexer	Mini Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage	Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Waage	770 Analysewaage	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Webcam	Moticam 1000	IMPAC Electronic GmbH, Frankfurt
Wärmeschränk	B 6060	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Wärmeschränk	Innoval 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellmühle	Schwingmühle MM200	Retsch, Haan
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Labofuge 400R Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Beckmann J2-21	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Vakuum Zentrifuge	Speed Vac concentrator	Savant Instruments



### 3.1.3 Antikörper

Antikörper	Antigen	Quelle	Firma/Bezugsquelle	Verdünnung
αHis	His <sub>6</sub> Tag	Maus	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	1: 10000
αHis	His <sub>6</sub> Tag	Maus	Clontech, Mountain View, CA, USA	1: 5000
αCOP1	N-terminus von AtCOP1	Kaninchen	Albrecht von Arnim, Universität Tennessee	1: 1000
αFKBP	FKBP51	Kaninchen	dianova, Hamburg	1: 1000
αStrep-Tag2	Strep-Tag2	Kaninchen	IBA GmbH, Göttingen	1: 2000
αCRY2	GST-AtCRY2	Kaninchen	El-Din-El-Assal <i>et al.</i> , 2001	1: 5000
αCRY2 (501-612)	AtCRY2(501-612)	Kaninchen	Oliver Kleiner, Universität Marburg	1:5000
α mouse IgG	AP-Konjugat Maus IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1: 10000
α rabbit IgG	AP-Konjugat Kaninchen IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1: 10000
α mouse IgG	HRP-Konjugat Maus IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1:10000
α rabbit IgG	HRP-Konjugat Kaninchen IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1: 10000
αCCT2	C-Terminus von AtCRY2	Kaninchen	Margaret Ahmad Universität Paris	1:1000
α tubulin	C-Terminus von α-tubulin isoform	Maus	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1: 2000
α rabbit IRDye <sup>TM</sup> 800 CW	Kaninchen IgG	Esel	Biomol GmbH, Hamburg	1: 10000
α mouse IRDye <sup>TM</sup> 700DX	Maus IgG	Esel	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg	1: 10000

### 3.1.4 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma MWG-Biotech GmbH, Ebersberg durchgeführt und diese in einer Konzentration von 100 pmol/μl verwendet.

Folgende Primer wurden eingesetzt um die gewünschten Konstrukte mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen herzustellen.

Restriktionsschnittstellen: **Bam**HI, **Hind**III, **Nco**I; **Bg** III; **Xho**I

#### **C-terminus von COP1 (131aa- 675aa) in pACYCDuet-1; pQE31, pET-28a [c-term COP1]**

5'-Primer:

Oligo#7 (06.06.06) 5'-**GGAT CCA** AGG GGT TGT GAT GTG TC-3'

3'-Primer:

Oligo#8 (06.06.06) 5'-**AAG CTT** ACG CAG CGA GTA CCA GAA CTT TG-3'

**C-terminus COP1 (210 aa- 675aa) in pQE-30 [HBK]**

5'- Primer

Oligo #5 (26.05.08) 5'-GGA TCC AGG GAC AGA TAT TCT GTA -3'

3'- Primer

Oligo #6 (26.05.08) 5'-AAG CTT TCA CGC AGC GAG TAC CAC AAC -3'

**C-terminus COP1 (386 aa- 675 aa) in pQE-30 [HBG]**

5'- Primer

Oligo #7 (26.05.08) 5'-GGA TCC TTT GCC ACT GCT GGT GTT- 3'

3'- Primer

Oligo #6 (26.05.08) 5'-AAG CTT TCA CGC AGC GAG TAC CAC AAC -3'

**C-terminus COP1 (210 aa – 675 aa) in pQE-60 [BNK]**

5'- Primer

Oligo #1 (26.05.08) 5'-CCA TGG ACA GAT ATT CTG TAA AG -3'

3'- Primer

Oligo #2 (26.05.08) 5'-AGA TCT CGC AGC GAG TAC CAC AAC -3'

**C-terminus COP1 (385 aa – 675 aa) in pQE-60 [BNG]**

5'- Primer

Oligo #3 (26.05.08) 5'-CCA TGG AGT TTG CCA CTG CTG GTG TT -3'

3'- Primer

Oligo #2 (26.05.08) 5'-AGA TCT CGC AGC GAG TAC CAC AAC -3'

**FKBP<sub>(v)</sub> mit C-terminus CRY2 (489 aa – 612 aa) in pET-51b (+) [FKBP-CCT2]**

5'-Primer:

Oligo#1 (01.07.06) 5'-GGA TCC GTC TAG AGG AGT GCA GGT GGA AAC-3'

3'-Primer:

Oligo#2 (01.07.06) 5'-GAA GCT TCT CGA GTC ATT TGC AAC CAT TTT TTC C-3'

**3.1.5 Plasmide**

Plasmid	Funktion	Beschreibung/Quelle	Resistenz
pQE60 mit FKBP(v)-CCT2	Template-DNA	Ausgangsmaterial; Gesa Rosenfeldt, Universität Marburg	Ampicillin
pBS-35S-YFP-COP1	Template-DNA	Ausgangsmaterial; Albrecht von Arnim Universität von Tennessee	Ampicillin
pGEM <sup>®</sup> -T	Sequenzierungsvektor	3'-T Überhänge an der Insertionsstelle; von Promega, Mannheim	Ampicillin
pACYCDuet-1	Expressionsvektor in <i>E.coli</i>	Zwei <i>Multiple cloning sites</i> (MCS) mit N-terminalen His- und S-Tags; von Novagen	Chloramphenicol
pET-51b(+)	Expressionsvektor in <i>E.coli</i>	mit N-terminalem Strep-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Ampicillin
pMAL-c2	Expressionsvektor in <i>E.coli</i>	mit <i>malE</i> Gen von <i>E.coli</i> ; kodiert für <i>maltose-binding-Protein</i> (MBP); von Biolabs	Ampicillin

Plasmid	Funktion	Beschreibung/Quelle	Resistenz
pQE30	Expressionsvektor in <i>E. coli</i>	mit N- terminalem His-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Ampicillin
pQE31	Expressionsvektor in <i>E. coli</i>	mit N- terminalem His-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Ampicillin
pQE60	Expressionsvektor in <i>E. coli</i>	mit C- terminalem His-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Ampicillin
pET-28a(+)	Expressionsvektor in <i>E. coli</i>	mit N- und C- terminalem His-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Kanamycin
pET15b(+)	Expressionsvektor in <i>E. coli</i>	mit C- terminalem His-Tag; von Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	Ampicillin

### 3.1.6 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Quelle
XL1-Blue	recA1endA1 gyrA1 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Klonierung und DNA-Präparation	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21[DE3]	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
TB1	Ara Δ (lac proAB) rpsL lacZΔm15	heterologe Proteinexpression	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
BL21 CodonPlus [DE3]-RIL	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>R</sup> gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>R</sup> ]	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
M15 [pREP4]	NaI <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup>	heterologe Proteinexpression	QIAGEN, Hilden
Rossetta	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm pRARE <sup>2</sup> (Cam <sup>R</sup> )	heterologe Proteinexpression	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
Origami	Δ (ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F <sup>-</sup> [lac <sup>+</sup> lacI]pro] gor522::Tn10 trxB (Kann <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	heterologe Proteinexpression	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
BL21 CodonPlus [DE3]-RIL [pREP4]	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>R</sup> gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>R</sup> ]	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21 [DE3]pLys	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	heterologe Proteinexpression	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Organismen Anzucht und Kultivierung

#### 3.2.1.1 *Escherichia coli*

Puffer und Medien	
LB-Medium	10 g/L Bacto™-Trypton; 5 g/L Bacto™-Yeast Extract; 10 g/L NaCl
TB-Medium	12 g/L Bacto™-Trypton; 24 g/L Bacto™-Yeast Extract; 4 ml Glycerol; 0.017 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.072 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$
LB-Agar-Platten	LB-Medium + 1.5% (w/v) Agar + Antibiotika-Stammlösung, Petrischalen: Ø 8.5 cm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert); 100µg/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
Chloramphenicol (Cm)	10 mg/ml Stammlösung in 100% Methanol (sterilfiltriert); 20µg/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest (sterilfiltriert); 25µg/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)

Die verwendeten *E.coli* Stämme wurden in Flüssigkulturen in LB- oder TB-Medium, versetzt mit den Resistenzen entsprechenden Antibiotika, bei 250 rpm im Schüttler mit variierender Temperatur (12°C, 30°C oder 37°C) unter aeroben Bedingungen angezogen. *E.coli* Kulturen in flüssigem LB- bzw. TB-Medium in einem Volumen von 3 ml wurden für DNA-Präparation, Stammhaltung als Glycerin-Gefrierkulturen und als Inokulum für größere Kulturvolumen (25 ml, 100 ml, 1 L und 9L) zur Proteinexpression mit anschließender Aufreinigung genutzt.

Zur Herstellung von Festmedium-Platten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) Bacto-Agar hinzugefügt. Nach der Dampfsterilisation wurde das Medium auf ca. 60°C abgekühlt, die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt, die Platten mit einem Volumen von ca. 15 ml in Petrischalen gegossen und nach dem Trocknen bei 4°C steril aufbewahrt. Die Kultivierung von *E.coli* auf LB-Agar-Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank und diente der Gewinnung von *E.coli* Einzelkolonien. Hierfür wurde die Zellsuspension nach einer Transformation mittels Drigalski-Spatel ausplattiert, bzw. als Ausgangsmaterial für die Anzucht mit folgender Proteinexpression ein Aliquot der Gefrierkultur entnommen und mittels Drei-Strich-Technik ausgestrichen.

Die Herstellung einer Gefrierkultur erfolgte indem 1 ml einer 3 ml Übernachtskultur bei 5000 x g und 4°C für 10 min pelletiert und in 1 ml 30 % (v/v) Glycerin-LB-Medium resuspendiert wurde oder indem 1 ml Kultur mit 1 ml 50 % (v/v) Glycerin-H<sub>2</sub>O Lösung versetzt wurde. Die Gefrierkulturen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Linien gibt die nachfolgende Tabelle mit Angaben zur Bezugsquelle sowie die Referenz, die auf die Generierung der verwendeten Mutanten-Linien Bezug nimmt. .

Verwendete Wildtyp Linien	
Ökotyp	Abkürzung
Landsberg erecta	Ler
Columbia	Col-O
Reschew	RLD

Verwendete Mutanten			
Bezeichnung	Referenz	Hintergrund	Quelle
<i>spa 1 (1-7)</i>	Fittinghoff <i>et al.</i> , 2006	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 1-7/2-1/3-1</i>	Laubinger <i>et al.</i> , 2004	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 1-7/3-1/4-1</i>	Laubinger <i>et al.</i> , 2004	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 2-1/3-1/4-1</i>	Fittinghoff <i>et al.</i> , 2006	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 1-7/2-1/4-1</i>	Laubinger <i>et al.</i> , 2004	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 1-1/2-1/3-1/4-1</i>	Laubinger <i>et al.</i> , 2004	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>cop 1-6</i>	Reed <i>et al.</i> , 1994	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>phyA -211</i>	Mc Nellis <i>et al.</i> , 1994	Col-0	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>phyA -201</i>	Reed <i>et al.</i> , 1993	Ler	Akira Nagatani, Kyoto
<i>phyB -5</i>	Reed <i>et al.</i> , 1993	Ler	Akira Nagatani, Kyoto
<i>phyA -101</i>	Dehesh <i>et al.</i> , 1993	RLD	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>spa 1-2</i>	Hoecker <i>et al.</i> , 1998	RLD	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>phyA -101/ spa 1-2</i>	Hoecker <i>et al.</i> , 1998	RLD	Ute Hoecker; Universität Köln
<i>phyA-412/cry1-1/cry2(fha1)</i>	Mockler <i>et al.</i> , 2003	Col-0	John Christie, Glasgow
<i>cry1-1/cry2(fha1)</i>	Yanovsky <i>et al.</i> , 2000	Ler	Margaret Ahmad, Paris

Trotz seiner wirtschaftlichen Unbedeutsamkeit ist *Arabidopsis thaliana* in der heutigen Forschung ein wichtiger Modellorganismus für höhere Pflanzen. Zugehörig zur Familie der Brassicaceae (Kreuzblütengewächsen) ist sie verwandt mit wichtigen Nutzpflanzen wie z.B. Raps, Kohl und Rettich.

Als Modellpflanze hat sich *A.thaliana* aus mehreren Gründen etabliert. Erstens beträgt die Generationszeit unter Langtagbedingungen nur 6 Wochen bei dennoch effizienter Samenproduktion. Zweitens ist die einfache Manipulation des genetischen Materials mittels direktem DNA-Transfer in Protoplasten oder über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation der Pflanze ein weiterer Vorteil für die Arbeit im Labor. Das kleine

Kerngenom von 128 Mb verteilt sich auf nur 5 Chromosomen und konnte bereits im Jahre 2000 vollständig entschlüsselt werden (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Diese Vorteile und das Vorhandensein zahlreicher Mutantenlinien machen *Arabidopsis thaliana* zum idealen Modellorganismus um eine ganze Reihe von Fragestellungen in der pflanzlichen Forschung anzugehen.

### Anzucht auf Platte

Puffer und Medien	
Sterilisations-Lösung	25% Hypochlorid Lösung (Roth, Karlsruhe)
½ MS Phytoagar-Platten	2,2 g/L MS Medium (ohne Vitamine); 0,5 g MES/L; 8 g/L Phytoagar; pH 5,7

Für die Herstellung der ½ MS Platten wurde zunächst 4,4g MS (ohne Vitamine) und 1g MES in Aqua bidest. gelöst und mit 1M KOH-Lösung auf pH 5,7 eingestellt. Nach der Zugabe von 16 g Phytoagar wurde das Medium auf 2 L aufgefüllt und für 20 min autoklaviert.

Zunächst wurden die Samen aller genutzten Wildtypen bzw. Mutantenlinien vor der Aussaat einer Oberflächensterilisation unterzogen. Dazu wurden jeweils 3 mg (ca. 100) Samen abgewogen und für 2x 10 min in Sterilisations-Lösung inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Samen in 0,15% Phytoagar resuspendiert und anschließend mit der Pipette auf die Platten aufgetropft. Die Platten wurden nach kurzer Trocknungsphase in der Sterilbank mit Parafilm verschlossen und anschließend einer viertägigen Stratifikation bei 4-6°C im Dunkeln unterzogen. Danach wurden die Samen zur Keiminduktion 4 Tage im Dunkel gehalten und anschließend je nach Versuch den entsprechenden Belichtungen ausgesetzt, die sich in Lichtqualität, -dauer und -intensität unterschieden.

### Anzucht auf Erde

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte aus einem Gemisch aus autoklavierter Erde und Vermiculit. Eine entsprechende Samenmenge wurde auf die Töpfe verteilt und nach einer Stratifikationsdauer von 4 Tagen bei 4-6°C im Dunkeln die Pflanzen entweder unter Langtagbedingungen (16 h Weißlicht/ 8 Dunkel-Zyklus) oder unter Kurztagbedingungen (8 h Weißlicht/ 16 h Dunkel-Zyklus) in Klimakammern angezogen. Die Lichtintensität betrug ca. 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei einer relativen Luftfeuchte von 60%. Während der Lichtphase betrug die Temperatur 22°C und wurde in der Dunkelphase auf 18°C gesenkt. Zur Nachzucht wurden die Keimlinge nach ca. 10 Tagen nochmals vereinzelt.

## Lichtbedingungen und Bestrahlungsversuche

Eingesetzte Lichtqualitäten und -intensitäten	
$\lambda$ (max)	Eingestellte Fluenzraten ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
471 nm (Blau)	0.01; 0.1; 1; 5; 10; 15; 30
660 nm (Hellrot)	0.01; 0.1; 1; 5; 10; 15; 30
740 nm (Dunkelrot)	0.01; 0.1; 1; 5; 10; 15; 30

Alle Bestrahlungsversuche von Keimlingen wurden in den Floral LEDs Lichtkammern von PlantClimatics CLF (Wertingen) durchgeführt. Mit Hilfe einer unterschiedlichen Anzahl von Filtern, bestehend aus belichtetem Fotopapier, und dem Optometer wurden bei oben genannten Wellenlängen die verschiedenen Fluenzraten eingestellt.

Nach Stratifikation und anschließender Keimungsphase von 4 Tagen im Dunkeln wurden die Keimlinge auf Platten durch Verwendung der entsprechenden Filter den verschiedenen Fluenzraten für 2 h ausgesetzt, anschließend geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Des Weiteren wurden bei konstanter Fluenzrate verteilt über 2 h zu verschiedenen Messzeitpunkten Keimlinge entnommen und ebenfalls direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Messung der Hypokotyllängen wurden die Keimlinge auf Platten vier Tage den verschiedenen Lichtverhältnissen ausgesetzt, danach mit einer Digitalkamera inklusive eines Längenstandards fotografiert und mit Hilfe des Programms *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) quantifiziert. Aus 20 Einzelmessungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die genauen Angaben zur je nach Versuchsansatz verwendeten Lichtqualität- und -quantität sind im Ergebnisteil den zugehörigen Bildunterschriften der graphischen Darstellung der Auswertung zu entnehmen.

### 3.2.1.3 Kultivierung der Insektenzelllinie IPLB-Sf21 (Sf21) von *Spodoptera frugiperda*

#### Insekten-Zelllinie Sf21

Die immortalisierte Insekten-Zelllinie *IPLB-Sf21* (Sf21) aus Ovar-Zellen des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977), einer Mottenart, wird zur Vermehrung von AcMNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) basierenden Expressions-Vektoren genutzt und sind Bestandteil des BacPAK™ Baculovirus Expression Systems (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA).

Die Zellen wurden bei 22°-30°C kultiviert, wobei ihre optimale Zellteilungsrate von 20-24 h bei 27°C liegt. Zur kontinuierlichen Virusinfektion wurden die Sf21 Zellen im Wärmeschrank bei 27°C entweder als *monolayer* oder in Lösung bzw. in Suspension kultiviert und konnten zwischen diesen Arten der Kultivierung transferiert werden. Nach ca. dreißig Durchgängen

wurde eine frische Kultur etabliert, indem in flüssigem Stickstoff gelagerte Stammlösungen aufgetaut und als Inokulum verwendet wurden.

### Anzucht und Kultivierung von Sf21 Zellen

5 ml BacPaK Komplett Medium (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) wurde in *Tissue Culture flasks* (25cm<sup>2</sup>; Stratagene, Amsterdam, Niederlande) auf 27°C erwärmt. Unter der Sterilbank wurde ein Aliquot der Sf21-Zellen nach Auftauen (max. 27°C) mit einer sterilen Einmal-Pipette zum vorgewärmten Medium dazugegeben und ~3 h inkubiert bis eine gewisse Anzahl an Zellen am Boden der Kulturflasche sichtbar haftete. Danach wurde das Medium vorsichtig (ohne die Zellen vom Boden zu lösen) entfernt und durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. Diese *Tissue Culture flask* wurden bei 27°C für ca. sieben Tage inkubiert bis sich eine konsistente *monolayer* Schicht aus Zellen gebildet hatte. Anschließend wurden die Zellen entweder zur weiteren Kultivierung in neues Medium überführt oder dienten als Ausgangsmaterial zur viralen Amplifikation (siehe 3.2.2.2) und anschließender Proteinexpression (siehe 3.2.3.2).

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

#### Calciumchlorid-Methode

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/L Bacto™-Trypton; 5 g/L Bacto™-Yeast Extract; 10 g/L NaCl
TB-Puffer	10 mM Pipes; 15 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 250 mM KCl, 55 mM MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O; pH 6.7
DMSO	Acros Organics, Geel, Belgien

Mit 2 ml einer Übernachtskultur des *E.coli* Stammes XL1-Blue oder BL21[DE3] wurden 250 ml steriles LB-Medium angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 18° C und 225 rpm. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6 der Zellkultur und anschließender zehnmütiger Abkühlungsphase auf Eis wurden die Kulturen bei 2500 x g und 4°C pelletiert und zweimal mit jeweils 40 ml eiskaltem TB-Puffer gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in einem Gemisch aus 9.3 ml TB-Puffer und 0.7 ml DMSO resuspendiert und nach erneuter Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte die Aliquotierung in Reaktionsgefäße (Mandel und Higa, 1970). Die kompetenten Zellen wurden entweder direkt verwendet oder nach Flüssigstickstoff-Behandlung bei -70°C gelagert.



## RF1 RF2-Methode

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/L Bacto™-Trypton; 5 g/L Bacto™-Yeast Extract; 10 g/L NaCl
RF1	RbCl <sub>2</sub> 100 mM; MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O 50 mM; KAc 30 mM; CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 10 mM; Glycerin 15 % (w/v)
RF2	MOPS 10 mM; RbCl <sub>2</sub> 10 mM; CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 75 mM; Glycerin 15 % (w/v)

50 ml steriles LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 225 rpm und 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 kultiviert. Danach wurde die Kultur bei 6000 rpm für 8 min abzentrifugiert und das Pellet in 8 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation von 1 h auf Eis und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml kaltem RF2-Puffer aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen nach wiederholter 30 minütiger Inkubation auf Eis aliquotiert und entweder direkt verwendet oder nach Flüssigstickstoff-Behandlung bei -70° C gelagert.

### 3.2.2.2 Transfektionsmethoden

#### Transformation von *Escherichia coli*

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/L Bacto™-Trypton; 5 g/L Bacto™-Yeast Extract; 10 g/L NaCl
LB-Agar-Platten	LB-Medium + 1.5% (w/v) Agar + Antibiotika-Stammlösung Petrischalen: Ø 8.5 cm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert); 100µl/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
Chloramphenicol (Cm)	10 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert); 34µl/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)

Für die Transformation mit Hilfe der „Heat-shock“ Methode (Mandel und Higa 1970, Hanahan 1983) wurde ein Aliquot entsprechender kompetenter *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl der entsprechenden Plasmid-DNA (maximal 20 ng) oder mit 2-10 µl (maximal 15 ng) des entsprechenden Ligationsansatzes versetzt. Diese Lösung wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C, gefolgt von einem Kälteschock von 2 min auf Eis. Abschließend wurden dem Transformationsansatz 900µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und für 1 h bei 37°C und 250rpm inkubiert.

Je nach Transformationseffizienz wurden 100-1000 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Bei der Verwendung von Ligationsansätzen zur Transformation wurden die Platten vor dem Ausplattieren mit X-Gal (50 mg/ml) und IPTG (100mM) behandelt um die Selektion der richtigen Einzelkolonien mittels Blau-Weiß-Test zu garantieren.

### Co-Transfektion von Sf21 Zellen

Der am häufigsten genutzte Baculovirus zur Proteinexpression in Insektenzellen ist der *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV). Aufgrund der Größe des viralen Genoms erfolgt die Konstruktion des rekombinanten Baculovirus Expressionsvektors in zwei Schritten erst nach Transfektion der Sf21 Zellen mit einem Zwischenschritt über einen bakteriellen Transfektor. Zunächst wird das Zielgen in die MCS (*multiple cloning site*) eines kleineren, bakteriellen Transfektors inseriert. Die MCS wird flankiert von dem Polyhedrin Promoter und einem Polyadenylierungssignal. Der Transfektor enthält zudem ein Antibiotika-Resistenzgen und einen Replikationsursprung zur Vermehrung in *E.coli*, der jedoch in Insektenzellen nicht repliziert werden kann. Im zweiten Schritt werden dann die Sf21 Zellen mit einem viralen Expressionsvektor und dem generierten Transfektor Co-transfeziert. Durch homologe Rekombination zwischen den viralen Sequenzen des Transfektors und den entsprechenden Sequenzen der viralen DNA des Expressionsvektors wird das Zielgen in das virale Genom inseriert.

Das BacPAK Baculovirus Expressions System (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) nutzt BacPAK6, einen speziell veränderten Virus, der die Konstruktion eines rekombinanten Expressionsvektors erleichtert. Durch Restriktion von BacPAK6 mit *Bsu36I* entstehen zwei Fragmente, wobei ein Fragment einen Teil des essentiellen Gens ORF1629 enthält. Der Transfektor enthält die fehlende ORF1629 Sequenz, so dass nur im Falle einer richtigen Rekombination in den Expressionsvektor eine vollständig zirkuläre, virale DNA entsteht, die alle notwendigen Gene zur Replikation des Virus enthält. Co-Transfektionen unter Verwendung von *Bsu36I* geschnittener viraler BacPAK6 DNA resultiert in der Bildung von annähernd 100% rekombinanter Virus-DNA.

#### 3.2.2.3 Isolation von Nukleinsäuren aus *E.coli*

### Plasmidpräparation durch Alkalische Lyse

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Trypton; 5 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Yeast Extract; 10 g/L NaCl
GTE/RNase (P1)	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0,02 mg RNase/ml
NaOH/SDS (L2)	0.1 oder 0.2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS
PAS (L3)	29.5 ml Essigsäure; KOH Plättchen bis pH 4.8; auf 100 ml mit Aqua bidest.
Ethanol	99 % (v/v); 70 % (v/v)
EB	10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
TB	10 mM Tris-HCl, pH 8.0
H <sub>2</sub> O	Aqua bidest.

Die Plasmidpräparation durch Alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979) erfolgte aus 2 ml einer Übernachtskultur von der entsprechenden *E.coli* Kultur. Nach Pelletierung der Zellen bei

20000 x g und RT für 1 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl L2 erfolgte eine Inkubation von 5 min auf Eis. Anschließend wurden 150 µl L3 der Lösung hinzugefügt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 10 min bei 20000 x g zentrifugiert und die sich im Überstand befindliche Plasmid-DNA in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 99 %igem Ethanol und 2 min Inkubationszeit bei RT. Durch Zentrifugation für 5 min bei 20000 x g und RT wurde die Plasmid-DNA pelletiert und nach einem abschließenden Waschschrift mit 70%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation bei RT getrocknet bis es sich weiß färbte.

Danach wurde die Plasmid-DNA je nach gewünschter Konzentration oder Verwendung in 20 - 50 µl TB, EB oder H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

### Midi- und Maxipräparation von Plasmid DNA

Puffer und Reagenzien	
P1-Puffer	Angaben siehe Hersteller; QIAGEN Plasmid Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)
P2-Puffer	
P3-Puffer	
QBT-Puffer	
QC-Puffer	
QF-Puffer	
Isopropanol	99,9 % (v/v)
Ethanol	70 % (v/v)

Eine 100 ml bzw. 500 ml *E.coli* Übernachtskultur in LB-Medium wurde mittels Zentrifugation von 15 min bei 6000 x g und 4° C pelletiert und in 4 ml bzw. 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach weiterer Zugabe von 4 ml bzw. 10 ml Puffer P2 wurde die Lösung durch leichtes Schütteln gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 4 ml bzw. 10 ml Puffer P3 hinzugegeben und 15 min bzw. 20 min auf Eis inkubiert.

Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 20000 x g und 4°C wurde der anschließend in neue Reaktionsgefäße überführte Überstand erneut unter gleichen Bedingungen für 15 min zentrifugiert. Nun wurde der QIAGEN-Tip 100 bzw. 500 mit 4 ml bzw. 10 ml QBT-Puffer equilibriert und der die Plasmid-DNA enthaltene Überstand aufgetragen. Nach Durchfluß des Überstandes wurde der QIAGEN-Tip mit 2 x 10 ml bzw. 2 x 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml bzw. 15 ml QF-Puffer in geeignete Reaktionsgefäße eluiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 3.5 ml bzw. 10.5 ml Isopropanol (RT), Mischung der Lösung und folgender Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min bei 4°C.. Nachdem der Überstand vorsichtig verworfen wurde, wurde das Pellet mit 2 ml bzw. 5 ml 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min bei RT gewaschen und der Überstand erneut vorsichtig verworfen. Nach dem Lufttrocknen des Pellet wurde die Plasmid-DNA in geeignetem Puffer mit gewünschtem Volumen gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

### 3.2.2.4 Aufreinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

#### Phenol-Chloroform-Extraktion

Puffer und Reagenzien	
Phenol	
Chloroform	
NaCl	5 M
Ethanol	99 % (v/v); 70 % (v/v)

100 µl einer DNA-Lösung wurden mit 100 µl Phenol versetzt und 1 min bei 20000 x g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthält, wurde vorsichtig ohne Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform und erneuter Zentrifugation für 1 min bei 20000 x g und RT wurde wieder die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 µl 5 M NaCl und 250 µl 99%iger Ethanol hinzugefügt. Die gefällte DNA wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min bei -80° C durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 x g und 4°C pelletiert.

Nach Lufttrocknen des DNA-Pellets wurde dieses in einem geeignetem Volumen Puffer gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

#### Isopropanol Fällung

Puffer und Reagenzien	
Natriumacetat	3 M; pH 6.0
Isopropanol	99,9 % (v/v)
Ethanol	70 % (v/v)

Diese Art der DNA-Fällung erlaubt die Trennung nach großen und kleinen DNA-Fragmenten, da größere DNA-Fragmente ausfallen wohingegen kleinere in Lösung verbleiben. 100 µl DNA-Lösung wurden mit 15 µl Natriumacetat-Lösung und 60 µl Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation für 25 min bei 20000 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, 20 min bei RT und 20000 x g abzentrifugiert, luftgetrocknet und in entsprechendem Puffervolumen resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20° C gelagert.

#### QIAquick PCR Purification Kit

Puffer und Reagenzien	
PB-Puffer	Angaben siehe Hersteller; (QIAGEN GmbH, Hilden)
EB-Puffer	

Das QIAquick PCR Purification Kit eignet sich zur Aufreinigung von Einzel- oder Doppelstrang DNA-Fragmenten von PCR-Reaktionen oder anderen Enzymreaktionen. Dazu wurde 1 Volumen DNA-Lösung mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt und gemischt. Die *QIAquick spin columns* wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA-Lösung zur Bindung an die Säulenmembran aufgetragen. Nach Zentrifugation von 30-60 Sekunden bei 20000 x g und RT wurde der Durchfluss verworfen und die DNA durch einen Waschschrift mit 0,75 ml PE-Puffer von Salzen gereinigt. Danach wurde erneut für 1 min bei 20000 x g und RT zentrifugiert, die *QIAquick spin columns* in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit geeignetem Puffer (TB, EB, H<sub>2</sub>O) in einem Volumen von 20 µl eluiert.

### 3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid DNA

Puffer und Reagenzien	
Agarose	QA-Agarose™ (Qbiogene, MP Biomedicals, Heidelberg)
TBE-Puffer (10x)	880 mM Tris-HCl; 880 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8.0
5 x DNA Probenpuffer	1 % (w/v) SDS ; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau; 100 mM EDTA; 50 % (v/v) Glycerin
Ethidiumbromid	1%ige Lösung in Aqua bidest. (Roth, Karlsruhe)

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 0.5 bis 25 kb Länge analytisch und präparativ auftrennen. Die Menge der verwendeten Agarose in den nichtdenaturierenden TBE-Agarosegelen hängt von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente (kb) ab. Es wurden 1% bzw. 2% Gele verwendet. 1 g bzw. 2 g Agarose wurden in 100 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollkommen gelöst hatte. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60°C wurden 15 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung in die Gelapparatur gegossen. Je nach gewünschtem Fassungsvermögen der Geltaschen wurden Kämme für 20 bzw. 50 µl verwendet. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses mit 1 x TBE-Puffer überschichtet und die Geltaschen mit den entsprechenden DNA-Proben beladen. Zuvor wurden die DNA-Proben mit 1/5-Volumen DNA-Probenpuffer versetzt, um die spezifische Dichte durch das enthaltene Glycerin zu erhöhen. Dies gewährleistet, dass die DNA in die Geltaschen sinkt und während der Auftrennung durch das Gel wandert. Zusätzlich enthält der DNA-Probenpuffer Bromphenolblau das während der Elektrophorese als Lauffront bei einer DNA-Fragmentgröße von ca. 100 bp sichtbar ist um in etwa die Laufgeschwindigkeit der DNA abschätzen zu können.

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Apparaturen mit einer angelegten Spannung von 100 V, in der DNA als Polyanion durch das Agarose-Gel zur Anode wandert. Durch die siebartige Struktur des Gels wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als große und ermöglicht somit eine Auftrennung der DNA-Fragmente anhand der Größe.

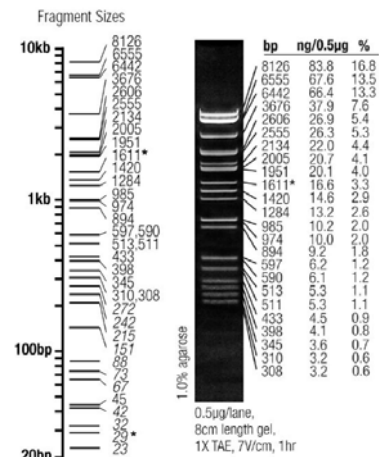
Die Detektion und Dokumentation der DNA-Fragmente erfolgte anhand der Fluoreszenz des in der DNA interkalierenden Ethidiumbromids mit einem UV-Transilluminator mit angeschlossenen Photodokumentationssystem.

### 3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung

Zur Bestimmung der Größen der verwendeten DNA-Fragmente wurde bei jeder Gelelektrophorese 10 µl eines DNA-Größenmarkers separat in einer Geltasche mit den Proben aufgetrennt. Die DNA-Fragmentgrößen des Markers waren durch Herstellerangaben bekannt und konnten somit als Größenstandard dienen.

Der Fluoreszenzleuchtstärke der einzelnen Fragmentbanden des Markers konnte eine jeweilige DNA-Konzentration nach Herstellerangaben zugeordnet werden. Da die Menge der jeweiligen aufgetragenen DNA-Proben bekannt war, konnte somit deren unbekannte Konzentration mittels visuellen Vergleichs der Leuchtstärken von Marker und aufgetrennten DNA-Fragmenten abgeschätzt werden.

Zur spektroskopischen Konzentrationsbestimmung von DNA Midi- oder Maxipräparationen wurde eine Absorptionsmessung von einem definierten Volumen der Probe bei 260 nm mit einem Photometer (UV-2401 oder Nano Drop ND 1000) durchgeführt und die Konzentration mittels folgender Formel errechnet:  $c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times V \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times F \text{ (Multiplikationsfaktor)}$ .



**Abb. 2.1: DNA-Marker.** λ-DNA/Eco47I (AvalI) (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

### 3.2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR)

Puffer und Reagenzien	
Pfu DNA-Polymerase ( <i>recombinant</i> )	in 20 mM Tris-HCl, pH 8.2; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; 100 mM KCl; 0.1% (v/v) Nonidet 40; 0.1% (v/v) Tween 20; 50% (v/v) Glycerin; MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Phusion DNA Polymerase	in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 100 mM KCl; 0.5% (v/v) Tween 20; 0.5% (v/v) Nonidet 40; 200µg/ml BSA; 50% (v/v) Glycerin; FINNZYMES OY, Espoo, Finnland
10x Pfu-Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
5x Phusion HF Puffer	FINNZYMES OY, Espoo, Finnland
dNTPs	jeweils 10 mM; MBI Fermentas, St.Leon-Rot
5'- und 3'-Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
MgCl <sub>2</sub>	25 mM; MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Mittels der PCR (*polymerase chain reaction*) lässt sich *in vitro* DNA vervielfältigen (Mullis und Faloona 1987). Hierbei wird die Fähigkeit von DNA-Polymerasen thermophiler Organismen genutzt auch bei hohen Temperaturen stabil und aktiv zu sein.

Die Standard PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Durch die Denaturierung der Template-DNA bei 95°C trennten sich die beiden DNA-Stränge auf. Anschließend wurde die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wurde die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerasen thermophiler Organismen, erhöht. Im folgenden Elongationsschritt wurden die Primer durch DNA-Neusynthese mittels zusätzlich zugefügten dNTPs verlängert, bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte wurde daher der zwischen den sequenzspezifischen Primern liegende DNA-Bereich exponentiell amplifiziert. Die Wahl der Primer ermöglichte spezifische Restriktionsschnittstellen in die flankierenden Sequenzen des amplifizierenden DNA-Bereiches für eine möglich folgende Klonierung mit einzubringen.

Ein typischer PCR-Ansatz ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Puffer und Reagenzien	Endkonzentration	Volumen für einen 20 µl Ansatz
Template DNA (10 – 50ng/µl)	10 ng	x µl
5'-Primer ( 10 µM)	0.5 µM	1 µl
3'-Primer ( 10 µM)	0.5 µM	1 µl
Polymerase Puffer (10x/5x)	1x	2 bzw. 4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM	1.6 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0.25 mM	0.5 µl
Polymerase (5 U/µl)	1 U	0.2 µl
dd H <sub>2</sub> O	-	x µl

Die PCR erfolgte in dünnwandigen 200 µl Reaktionsgefäßen (Multiply®Pro, Sarstedt) in einem PCR-Cycler (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm. Dabei richtet sich die optimale Annealing-Temperatur nach der Schmelztemperatur der Primer mit Abzug von 5°C. Die Elongationszeit ist abhängig von der verwendeten Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereiches.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	0.75	28-35
Primer-Annealing	50-65	0.5	
Elongation	72	1-4	
Finale Elongation	72	5	1

## Reinigung und Extraktion von Nukleinsäuren bzw. Plasmid DNA

Puffer und Reagenzien	
QX1-Puffer	Angaben siehe Hersteller; QIAEX II Gel Extraction Kit; QIAGEN GmbH, Hilden
QIAEX II-Matrix	
PE-Puffer	

Die über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator visualisiert und mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten, wobei möglichst wenig Agarose-Gel mit ausgeschnitten werden sollte. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 3 Volumen QX1 Puffer versetzt (z.B. 300µl Puffer zu 100 mg Gel). Abhängig von der enthaltenen DNA-Menge wurde danach die entsprechende Menge QIAEX II-Matrix nach Herstellerprotokoll dazugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 50°C im Heizblock wurde 30 Sekunden bei 20000 x g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zunächst mit 500 µl QX1-Puffer und danach mit 500 µl PE-Puffer mittels Zentrifugation von 30 Sekunden bei 20000 x g und RT gewaschen. Nachdem das Pellet durch lufttrocknen weiß geworden war, wurde es in entsprechendem Puffer (TB, EB oder H<sub>2</sub>O) mit gewünschtem Volumen gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

## Restriktion von DNA

Puffer und Restriktionsenzyme	Firma
<i>Nco</i> I (10U/ µl)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Hind</i> III (10U/ µl)	
<i>Bam</i> HI (10U/ µl)	
<i>Xho</i> I (10U/ µl)	
<i>Bgl</i> II (10U/ µl)	
Puffer Y <sup>+</sup> (10x)	33 mM Tris-Acetat, pH 7.9; 10 mM Mg-Acetat; 66 mM K-Acetat; 0.1 mg/ml BSA; MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Puffer R <sup>+</sup> (10x)	10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 0.1 mg/ml BSA; MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Die Restriktion von DNA wurde für die Ligation, für die Kontrolle von PCR-Produkten oder zur DNA-Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Dabei enthielt ein Restriktionsansatz 1-5 µl DNA-Lösung, 3-15 Units der entsprechenden sequenzerkennungs-spezifischen Restriktionsenzyme mit dem jeweiligen notwendigen Puffer (1/10 des Endvolumens). Die Restriktion erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C für 2 h oder über Nacht bei RT mit verringerter Enzymmenge. Inaktiviert wurde die Reaktion entweder durch direkte Zugabe des DNA-Probenpuffers oder durch Erhitzen der Proben auf 70°C. Die anschließende Kontrolle der Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese eines Aliquots des Ansatzes für die analytische Restriktion, bzw. für die präparative Restriktion wurde der gesamte Ansatz für eine nachfolgende Gel-Extraktion der DNA-Fragmente aufgetrennt.



## Generierung von Adenosin Überhängen

Ein Nachteil der in der PCR verwendeten Polymerasen (Pfu- oder Phusion-Polymerase) gegenüber der Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* ist einerseits ihre geringere Prozessivität, das heißt ihre geringere Syntheserate, und andererseits besitzen ihre Amplifikationsprodukte glatte Enden (*blunt ends*) wohingegen die Amplifikationsprodukte der Taq-DNA-Polymerase am Ende zusätzliche Basen, meist Adenosine, anhängen.

Um die Ligation der PCR-Produkte in den Sequenzierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, Mannheim) zu gewährleisten sind jedoch diese Adenosin-Überhänge notwendig, da der Vektor in der Insertionsstelle einzelsträngige Thymidin-Überhänge besitzt. Die Adenosin-Überhänge wurden generiert, indem die PCR-Produkte nach Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert, bei Bedarf aufkonzentriert und im PCR-Cycler abschließend zusammen mit der Taq-DNA-Polymerase und zusätzlich hinzugefügten dATPs für 20-40 min bei 70° C inkubiert wurden.

Die Zusammensetzung eines Ansatzes zur Generierung von Adenosin-Überhängen kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden:

Puffer und Reagenzien	Endkonzentration	Volumen für 10 µl Ansatz
Taq-Polymerase Puffer 10x	1x	1 µl
dATPs (1 mM)	0,2 mM	2 µl
Taq-Polymerase (5U/ µl)	1 U	0.2 µl
dd H <sub>2</sub> O	-	2.8 µl
PCR-Produkt	10-50 ng	4 µl

## Ligation

Puffer und Reagenzien	
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim oder
10x Ligations-Puffer	MBI Fermentas St.Leon-Rot
Zielvektor	Promega, Mannheim oder Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
PCR-Produkt (Insert)	C-terminus COP1; FKBP(v)-CCT2; Strep-Taq-FKBP(v)-CCT2

Die Klonierung von DNA-Fragmenten bzw. von PCR-Produkten in entsprechende Vektoren erfolgte über die Ligation. Die Berechnung der Menge an zu verwendender DNA (Vektor und Insert) wurde mittels nachfolgender Formel ermittelt:

$$\text{Insert [ng]} = (5 \times \text{Vektor [ng]} \times \text{Insert [bp]}) / \text{Vektor [bp]}$$

Ein üblicher Ligationsansatz von 10 µl enthielt 10-50 ng Vektor DNA, die entsprechend berechnete Menge an Insert-DNA, 10x Ligationspuffer und die T4 DNA-Ligase nach Herstellerangaben. Nach 1 h Inkubation bei RT oder alternativ bei 4°C über Nacht konnte der Ligationsansatz direkt zur Transformation in kompetente *E.coli* Zellen verwendet werden. Pro

PCR-Produkt wurden zwei Ligationsansätze durchgeführt, jeweils eine Ligation in den pGEM®-T Sequenzierungsvektor und eine Ligation in den entsprechenden Expressionsvektor.

### Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

Zur Kontrolle der jeweiligen Sequenzen nach PCR-Amplifikation und Ligation in den pGEM®-T Vektor wurden die einzelnen Konstrukte vor der Proteinexpression sequenziert. Die Sequenzierung wurde bei der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) in Auftrag gegeben. Die Sequenzierung der einzelnen generierten Konstrukte im pGEM®-T Vektor erfolgte mit folgenden Primern: pUC/M13 Forward Primer und pUC/M13 Reverse Primer (Sequenz siehe GATC Biotech AG, Konstanz).

Das Ergebnis der jeweiligen Sequenzanalysen wurde in Form eines Elektropherogramms (ABI-file) und einer daraus abgeleiteten Sequenz (FASTA-file) geliefert. Die einzelnen Sequenz-files wurden mit dem Vector NTI® Suite Programm (Informax, Maryland, USA) ausgewertet und bearbeitet.

## 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.3.1 in-silico Analysen

Um eine Vorhersage über Stabilität und benötigte Pufferbedingungen für die jeweiligen rekombinant exprimierten Proteine machen zu können wurde mit Hilfe der bekannten Aminosäuresequenz und der ProtParam Software ([www.expasy.org](http://www.expasy.org); Swiss-Prot, ExPASy Proteomics tools, Schweiz) verschiedene Parameter ermittelt. Das Programm ermittelt anhand der Aminosäuresequenz das Molekulargewicht (in kDa), den Isoelektrischen Punkt, die Halbwertszeit in verschiedenen Organismen und den molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine. Zusätzlich macht das Programm noch eine Aussage über die Stabilität, indem es dem jeweiligen Protein ein Stabilitätsindex zuweist. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei allen ermittelten Werten nur um eine theoretische Berechnung handelt.

### 3.2.3.2 Proteinexpression

#### in *Escherichia coli*

Puffer und Reagenzien	
LB-Medium	10 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Trypton; 5 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Yeast Extract; 10 g/L NaCl
TB-Medium	12 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Trypton; 24 g/L Bacto <sup>TM</sup> -Yeast Extract; 4 ml Glycerol; 0.017 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0.072 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
LB-Agar-Platten	LB-Medium + 1.5% (w/v) Agar + Antibiotika-Stammlösung Petrischalen: Ø 8.5 cm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
Ampicillin	100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert); 100µl/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
Chloramphenicol	10 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert); 34µl/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
Kanamycin	50 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest (sterilfiltriert); 25µg/ml Arbeitskonzentration; (Roth, Karlsruhe)
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in Aqua bidest.(sterilfiltriert)
Waschpuffer PBS (10x)	1.4M NaCl; 30 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O; 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)

Die Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine erfolgte in den entsprechenden *E.coli* Stämmen (siehe Material 3.2.1.1) über einen IPTG-induzierbaren Promotor in den entsprechenden Expressionsvektoren (siehe Material 3.1.5).

In den Vektoren wird die Expression des jeweiligen in die MCS klonierten Transgens durch einen starken Phagen T5 Promotor, im Fall der pQE-Expressionsvektoren, der durch die *E.coli* eigene RNA Polymerase erkannt wird, im Zusammenspiel mit dem lac Operator gesteuert. Die pET-Expressionsvektoren nutzen einen T7 Promotor, der nur von der T7-RNA Polymerase erkannt wird, die zusätzlich auf dem lysogenen Phagen λDE3 chromosomal im *E.coli*- Stamm BL21(DE3) codiert ist. Die Transkription der Transgene wird vom lac-Repressor bis zur Zugabe von IPTG unterdrückt.

Die Induktion der Protein-Überexpression erfolgt mit der Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) in einer Endkonzentration von 1 mM. IPTG ist ein nicht abbaubares Lactose-Analogon welches die Repression des lac-Operators verhindert indem es den lac-Repressor bindet und somit die Transkription und Translation des Transgen erlaubt, die noch durch eine Ribosomale Bindungsstelle (RBS) vor dem Insert verstärkt wird.

Nach erfolgreicher Generierung der Konstrukte über PCR, Ligation, Sequenzierung und Transformation in die entsprechenden *E. coli* Expressionsstämme wurde zunächst eine Expressionskinetik des jeweiligen rekombinanten Proteins zur Festlegung der optimalen Expressionsbedingungen erstellt. Es wurden verschiedene Temperaturen, Medien und Expressionszeiten getestet. Hierzu wurde für die Starterkultur eine Kolonie der entsprechenden Transformanten von LB-Agar-Platten in 25 ml LB-Medium, unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika, über Nacht bei 37°C und 250 rpm angezogen.

Für die Analyse der Kinetik der Proteinexpression wurden 100ml Medium mit 10 ml der entsprechenden Starterkultur im Verhältnis 1/10 inokuliert. Das weitere Wachstum der

Kulturen erfolgte bei der jeweiligen zu testenden Temperatur bei 250 rpm. Die Induktion der Expression erfolgte mittels Zugabe von IPTG während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8. Nach der Induktion der Expression wurden je zwei 1 ml Aliquots von jeder Expressionskultur in einem 24-h Zeitraum (Zeitpunkte: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 24h,) entnommen und bei 20000 x g bei 4° C für 1 min pelletiert. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung, der Proteinextraktion, bei -20°C gelagert. Die restliche Kultur wurde ebenfalls abzentrifugiert und das Zellpellet mit 1x PBS gewaschen und für eine mögliche die Proteinaufreinigung bei -20°C gelagert.

Nach der Optimierung der Expressionsbedingungen durch die kinetische Analyse der Proteinextrakte wurden die gleichen Bedingungen für eine Expression mit größerem Kulturvolumen (*large scale*) gewählt.

### Sf21 *Baculovirus* Expressionssystem

Sf21 Insektenzellen wurden entweder in 30 ml Lösung oder als Monolayer bei 27°C kultiviert. Eine Kultur mit gesunden, sich teilenden Insektenzellen (1x10<sup>6</sup> Zellen/ml) wurde ausgewählt und mit 2,5 ml His-CRY2 Virus-Lösung infiziert (Titer 10<sup>6</sup> pfu). Die Kulturbedälter wurden vorsichtig geschwenkt um die Virus-Lösung gleichmäßig zu verteilen ohne die angehafteten Insektenzellen abzulösen und bei 27°C für weiter 72 h inkubiert. Anschließend wurden anhaftende Zellen im Monolayer durch vorsichtiges Schwenken abgelöst. In Lösung wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 100 x g in einem sterilen 50 ml Falcon pelletiert. Der jeweilige Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt und später als erneute Virus-Lösung zur Infizierung frischer Insektenzellen genutzt. Das Pellet wurde mit 1x PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt, bzw. für eine längere Lagerung bei -80°C.

### *in vitro* Translation und Transkription (TNT)

Das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System der Firma Promega (Mannheim) beruht auf dem Prinzip der zellfreien Proteinexpression und bietet gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation eukaryotischer Gene. Hierbei wird die Problematik einer möglichen Toxizität oder einer verfrühten Degradation der Endprodukte, die in geläufigen Expressionssystemen (z.B. in *Escherichia coli*) vorkommen können, umgangen, dadurch das alle nötigen Komponenten in einem zellfreien Lysat ohne störende Elemente wie z.B. Proteasen vorhanden sind .

Alle Schritte wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. (Instruction manuell # TB126, Promega, Mannheim). Die Kit-Komponenten wurden nach Auftauen in den vorgegebenen Mengen auf Eis für eine Reaktion zusammen mit der entsprechenden Plasmid-DNA und den radioaktiv markierten Aminosäuren ([<sup>35</sup>S] Methionin) pipettiert. Nach Inkubation für 1 h bei

30°C wurde die Reaktion entweder eingefroren (-70°C) oder direkt für weitere anschließende Experimente verwendet.

### 3.2.3.3 Proteinextraktionen

aus *Escherichia coli*

Puffer und Reagenzien	
Sorensen's Phosphatpuffer A	200 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
Sorensen's Phosphatpuffer B	200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
<i>E.coli</i> -Lysis-Puffer (2x)	100 mM Na-Phosphat: 42 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 8 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 600 mM NaCl; 20 mM β-Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 20 mM Imidazol; (sterilfiltriert)
Lysozym-Stammlösung	10 mg/ml Lysozym in Aqua bidest. (sterilfiltriert)
Protease-Inhibitoren-Stammlösungen (sterilfiltriert)	200 mM Benzamidin in Aqua bidest. 0.8 mM E-64 in Aqua bidest. 1.5 mM Pepstatin A in 90% (v/v) Methanol + 10% (v/v) Essigsäure 100 mM PMSF in 99% Ethanol
5 x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6.8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau
<i>E.coli</i> -Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitoren	1 x <i>E.coli</i> -Lysis-Puffer; 10 mM Benzamidin; 14 µM E-64; 8.8 µM Pepstatin A; 4.5 mM PMSF; 1 mg/ml Lysozym

Für die Analyse der einzelnen Expressionskinetiken wurden die Gesamtproteinextrakte und die löslichen Proteinextrakte der verschiedenen Expressionen untersucht.

Zur Herstellung der Gesamtproteinextrakte aus *E.coli* wurden die Zellpellets 1 h auf Eis aufgetaut und mit 100 µl 1x SDS Probenpuffer 10 min bei 95°C aufgeköcht. Danach wurden die Proben bei 20000 x g und RT für 1 min abzentrifugiert um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration mit der Amidoschwarz Methode ermittelt.

Zur Herstellung des löslichen Proteinextraktes wurden die Zellen lysiert und anschließend mittels Ultraschall aufgebrochen. Dafür wurden die Zellpellets für 1 h auf Eis aufgetaut und in 100 µl 1x *E.coli*-Lysis-Puffer resuspendiert mit einer Lysozym Endkonzentration von 1 mg/ml. Anschließend wurden die Proben für 1 h zur Lyse der bakteriellen Zellwand auf dem Tischschüttler bei 100 rpm auf Eis inkubiert. Der Zellaufbruch erfolgte durch 3 Ultraschallzyklen von 10 Sekunden mit je 10 Sekunden Kühlung oder im Ultraschall Bad. Nach abschließender Zentrifugation der Lysate für 25 min bei 4°C und 20000 x g wurde der Überstand mit dem löslichen Proteinextrakt in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mittels Amidoschwarz Methode die Proteinkonzentration ermittelt.

Der Zellaufbruch größerer Kulturvolumina zur Proteinaufreinigung erfolgte mittels French Press. Hierfür wurde das Zellpellet nach Auftauen auf Eis in 1x *E.coli*-Lysis-Puffer (2 ml Lysis-Puffer pro 1g Zellpellet) resuspendiert und mittels French Press in drei Zyklen aufgebrochen. Nach Zentrifugation für 25 min bei 40000 x g und 4°C und nachfolgender

Filtration des Überstandes durch einen 0.22 µm Sterilfilter zur Entfernung möglicher Proteinaggregate wurden die Lysate direkt für die Affinitätschromatographie verwendet.

#### aus *Arabidopsis thaliana*

Puffer und Reagenzien	
Proteinextraktionspuffer	90% (v/v) Aceton; 10% (v/v) Trichloressigsäure (TCA); 0,07% (v/v) β-Mercaptoethanol
Waschpuffer	100% (v/v) Aceton; 0,07% (v/v) β-Mercaptoethanol
5 x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6.8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau

Zur Gewinnung der löslichen Proteinfractionen aus Pflanzen (Shultz *et al.*, 2005) wurde das Ausgangsmaterial, Keimlinge, bzw. Blätter, gefroren in flüssigem Stickstoff mit Hilfe der Zelmühle zerkleinert (3x je 30 Sek. bei 30 Hz) und anschließend in 1 ml eiskaltem Proteinextraktionspuffer pro 1 g zerkleinertem Pflanzenmaterial aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C für 30 min wurde der klare Überstand in neue *spin columns* überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 20000 x g und 4°C für 2 min wurde die lösliche, gefilterte Proteinfraction in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Alle Aufbruchvorgänge wurden unter Sicherheitslicht, d.h. Rotlicht. bzw. Grünlicht, durchgeführt.

Für die Extraktion des Proteingestamtextraktes wurde das pulverisierte Pflanzenmaterial in 1 ml eiskaltem Proteinextraktionspuffer resuspendiert und für 1 h oder über Nacht bei -20°C zur Fällung der Proteine inkubiert,. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C für 15 min wurde das Pellet dreimal mit eiskaltem Waschpuffer unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Im Folgenden wurden die letzten Acetonreste aus dem Pellet durch Vakuumzentrifugation für 15 min bei RT entfernt und das Pellet anschließend in 1x SDS Probenpuffer für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Nach Zentrifugation von 15 min bei RT und 20000 x g wurde der Proteingestamtextrakt in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Auch hier erfolgten alle Schritte im Sicherheitslicht.

#### aus Sf21-Insektenzellen

Puffer und Reagenzien	
Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7.6; 500 mM NaCl; 20 mM β-Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM β-Mercaptoethanol; 20 µg/ml Aprotinin; Leupeptin

Nach erfolgter Expression des gewünschten, rekombinanten Proteins und vorsichtiger Ernte der Zellen (siehe 3.2.3.2.3) erfolgte die Zelllyse. Die auf Eis aufgetauten Zellen wurden mit 2,5 ml eiskaltem Lysis-Puffer versetzt und resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h auf Eis auf dem Tischschüttler bei 100 rpm zur im Dunkeln stattfindenden Lyse der Zellen.

Anschließend wurden die Zellen durch Ultrazentrifugation für 15 min bei 18000 x g und 4°C pelletiert und der die löslichen Proteine enthaltene Überstand gefiltert (0.22 µm Sterilfilter). Je nach Volumina des Lysates erfolgte die Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie entweder im *Batch-Verfahren* oder mit dem *ÄKTA-Purifier* (siehe 3.2.3.9 oder 3.2.3.9). Zur späteren Verifizierung der Proteinexpression wurde ein Aliquot von 20 µl des Lysates vor der Aufreinigung entnommen, in 5 µl 1x SDS Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht.

#### 3.2.3.4 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen mit Amidoschwarz

Puffer und Reagenzien	
Amidoschwarzlösung	90% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; Amidoschwarz 10B (Roth, Karlsruhe) bis zu einer OD <sub>615</sub> = 10
Waschlösung	99% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Proteinstandard	10 mg/ml BSA

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen wurde die Amidoschwarz Methode verwendet (Popov *et al.*, 1975). Das Prinzip beruht auf der spezifischen, quantitativen Bindung des Farbstoffes Amidoschwarz an frei zugänglichen Aminogruppen, der durch ein Methanol-Essigsäure-Gemisch (9:1) präzipitierten Proteine. Ein Überschuss an ungebundenem Amidoschwarz wurde durch einen Waschschriff mit der Waschlösung entfernt. Bei der Resuspension der präzipitierten Proteine in 0.2 M NaOH-Lösung wurde der Farbstoff wieder in Lösung gebracht und konnte photometrisch bei 615 nm quantifiziert werden. Anhand einer vorher erstellten Eichkurve mit verschiedenen, definiert konzentrierten BSA-Lösungen konnte somit die unbekannte Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden.

Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl der jeweiligen zu bestimmenden Proteinlösung auf 200 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt und mit 800 µl Amidoschwarzlösung vermischt. Nach Zentrifugation bei 20000 x g für 15 min bei RT wurde der Überstand vorsichtig verworfen und 1 ml Waschlösung dazugegeben. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand verworfen, das präzipitierte Proteinpellet ca. 20 min bei RT getrocknet und anschließend in 1 ml 0.2 M NaOH Lösung resuspendiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte als Dreifachbestimmung gegen eine ebenso behandelte, proteinfreie Referenz.

### 3.2.3.5 Denaturierende SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Puffer und Reagenzien	
Trenngel (10%)	10% (v/v) Acrylamid; 0.265% (v/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 0.1% (w/v) SDS
Sammelgel (3.5%)	3.5% (v/v) Acrylamid; 0.13% (v/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.2% (w/v) SDS
Abdichtungsgel	1 ml Trenngel + 16 µl 10% (w/v) APS + 2.4 µl TEMED (Roth, Karlsruhe)
Polymerisationsstarter	10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat (APS); TEMED (Roth, Karlsruhe)
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris; 1.92 M Glycin; 1% (w/v) SDS (pH nicht einstellen)
5 x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6.8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau
Größenmarker	Sigma Molekulargewichtsmarker 7B2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Page Ruler™ prestained (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

Für die Lämmli-Gele (Laemmli 1970) wurde eine Mini Protean® 3-Gel-Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Trenn- und Sammelgel enthalten jeweils Tris-HCl Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten, deren Funktion es ist, die Proteinproben im Sammelgel zunächst auf eine Lauffront zu bringen um eine hohe Trennschärfe im folgenden Trenngel zu erzielen. Die Denaturierung der Proteine wird im Polyacrylamidgel durch Sodium-dodecyl-Sulfat (SDS) erreicht. Bei SDS handelt es sich um eine Detergenz, welches durch Störung der hydrophoben Interaktionen die Proteine denaturiert und zusätzlich ein ähnliches Ladungs/Massen-Verhältnis erzielt, da die negativ geladenen SDS-Moleküle mit den Proteinen komplexiert sind (1 SDS-Molekül/2 Aminosäuren). Die Auftrennung der Proteine erfolgt dadurch unabhängig von ihrer Nettoladung nur nach ihrem Molekulargewicht indem die Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode wandern.

Die Menge der zu pipettierenden Lösungen für zwei Gele (Größe: 80 x 50 x 0,75 mm (nur Trenngel) ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Stammlösung	Trenngel (10%)	Sammelgel (3.5%)
20% Acrylamid + 0.53% Bisacrylamid	5 ml	1.25 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.25 ml
Aqua bidest.	2.5 ml	2.45 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	40 µl	37.5 µl
TEMED	6 µl	2.5 µl

Der Zusammenbau der Gieß-Apparatur erfolgte nach Reinigung der Bestandteile mit Ethanol. Zunächst dient eine schnellpolymerisierende Acrylamid/Bisacrylamidlösung zum Abdichten der Gelkammern. Danach wurde das 10%ige Trenngel gegossen und mit 50% (v/v) Isopropanol überschichtet, um eine Austrocknung während der Polymerisationszeit von ca. 30 min zu verhindern und um eine glatte Oberfläche zu schaffen. Nach Entfernung des Isopropanols konnte das 3.5%ige Sammelgel gegossen werden, dass sofort mit Kämmen bestückt wurde, die die späteren Geltaschen mit einem Volumen von 25 µl aussparen. Nach



ausreichender Polymerisationszeit der Mini-Gele und dem Entfernen der Kämme wurden die Mini-Gele in die entsprechenden vertikalen Elektrophoresekammer eingespannt und zuerst die Kathoden- und anschließend die Anodenräume mit dem Laufpuffer aufgefüllt.

Die Proben und der Proteingrößenmarker wurden vor dem Laden in die Geltaschen 5 min bei 95°C erhitzt. Lösliche Proteinextrakte bzw. Eluate wurden vor dem Erhitzen mit 1x SDS Probenpuffer versetzt. Es wurden 3-5 µl Größenmarker verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 300 mV für ca. 30-45 min. Sobald die mit Bromphenolblau gefärbte Lauffront das Gelende erreicht hatte, wurden die Mini-Gele aus der Kammer entnommen und das Sammelgel entfernt. Je nach weiterer Verwendung erfolgte entweder der Nachweis der Proteine durch eine Coomassie-Färbung oder der Nachweis spezifischer Proteine durch eine immunologische Detektion mittels Antikörper.

### Färbung von SDS-Page Gelen mit Coomassie

Puffer und Reagenzien	
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0.05% (w/v) Coomassie R250
Entfärber	10% (v/v) Essigsäure

Um Proteine in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden die Gele nach der Elektrophorese für ca. 2 h oder über Nacht auf dem Tischschüttler bei 250 rpm in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Gele in der Entfärberlösung über Nacht inkubiert, so dass der Gelhintergrund entfärbt und die Proteinbanden sichtbar gemacht wurden. Die Färbung sowie die Entfärbung können deutlich beschleunigt werden, wenn die Gele mit der entsprechenden Lösung in der Mikrowelle bei ca. 70°C kurz inkubiert werden. Zur Lagerung der Gele wurden diese nach der Entfärbung in Aqua bidest. äquilibriert, zwischen zwei Lagen angefeuchteter Zellophanfolie luftfrei in einem Rahmen eingespannt und für mehrere Tage getrocknet.

### 3.2.3.6 Western Transfer auf PVDF und NCP Membranen

Puffer und Reagenzien	
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl, pH 9.2; 39 mM Glycin; 0.0372% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol
Membran	Porablot PVDF/ NCP (Macherey & Nagel, Düren)
Blotting-Papier (Whatman paper)	MN 218 B (Macherey & Nagel, Düren)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen ist es notwendig, sie zunächst für den spezifischen Antikörper frei zugänglich zu machen. Daher erfolgte ein Transfer der Proteine mittels Western Blot auf eine Membran, die diese aufgrund einer hohen Affinität zu Proteinen bindet (Renart *et al.*, 1979, Towbin *et al.*, 1979).

Zur Vorbereitung des Transfers wurden die Mini-Gele nach der Elektrophorese für 30 min in Transferpuffer bei leichtem Schwenken (50 rpm) äquilibriert. Die PVDF- oder NCP-Membran und das *Blotting*-Papier wurden auf die vorher abgemessene Größe des Mini-Gels zugeschnitten. Die Äquilibration der Membran und des *Blotting*-Papieres erfolgte für 15 min in Transferpuffer. Die PVDF-Membran musste jedoch zuvor durch eine Inkubation in 100% Methanol für 5 min aktiviert werden, um die Membranoberfläche benetzbar zu machen im Gegensatz zur NCP-Membran. Der Zusammenbau erfolgte nach folgendem Schema: Auf einer Glasplatte wurden luftblasenfrei *Blotting*-Papier gefolgt von PVDF- oder NCP-Membran und dem äquilibrierten Mini-Gel aufeinandergelegt. Danach wurde das Mini-Gel mit *Blotting*-Papier luftblasenfrei bedeckt. Für die Semi-Dry-Blotting-Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde der Stapel in die Blot-Apparatur auf eine Graphitelektrode überführt und der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 21 Volt für 1 h. Der elektrophoretische Transfer im Wet-Blot System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) erfolgte bei 100 Volt und 0,35 A für ebenfalls 1 h.

Nach Abbau der Blot-Apparatur wurde die Membran vor ihrer weiteren Verwendung nochmals für 10 min in Transferpuffer gewaschen, um mögliche Gelreste zu entfernen. Für eine Überprüfung des Transfers wurde das Mini-Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen.

### 3.2.3.7 Immunologische Nachweise von Proteinen

Puffer und Reagenzien	
TBS-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl
TBS-T Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% (v/v) Tween20
Blocking-Puffer	5% (w/v)Milchpulver in TBS-Puffer
Milchpulver	Bio-Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH)
Primärer Antikörper	1: 1000-1:5000 in TBS-T Puffer + 0.02% NaN <sub>3</sub>
Sekundärer Antikörper	1: 10.000 in TBS-T Puffer + 5% Milchpulver + 0.02% NaN <sub>3</sub>

Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mittels Antikörper-Detektion. Dafür wurde die PVDF- oder NCP-Membran nach dem Western Transfer zunächst 1 h in *Blocking*-Puffer bei RT geschwenkt oder alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert. Dies diente der Sättigung der Membran mit Proteinen aus dem Magermilchpulver, um eine spätere unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Bei Verwendung des Strep-Tag II Antikörper wurde die Membran nach dem Waschen zusätzlich 10 min in TBS-T Puffer mit 2 µg/ml Avidin inkubiert, um das endogene Biotin-Carboxyl-Trägerprotein (BCCP) aus *E.coli* zu blocken. In diesem Fall wurde außerdem nicht mit Milchpulver sondern nur mit 4% (w/v) BSA geblockt, da Milch eine reiche Biotin-Quelle ist und die Affinität vom Strep-Tag II Antikörper zu Biotin sehr hoch ist. Alle folgenden Schritte wurden bei RT in einem Volumen von 20 ml pro Membran durchgeführt. Nach dem Blocken wurde die Membran mit TBS-T Puffer 3x je

10 min gewaschen und anschließend in der primären Antikörper-Lösung unter leichtem Schwenken für 1 h inkubiert. Für mehrfache Verwendung der primären Antikörper-Lösung wurde dieser 0.02%  $\text{NaN}_3$  zugesetzt. Unspezifische gebundene und überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T Puffer für je 10 min entfernt. Danach folgte eine weitere Inkubation der Membran für 1 h in der sekundären Antikörper-Lösung. Je nach verwendeter Nachweismethode war der sekundäre Antikörper entweder mit *horse-radish peroxidase* (HRP) für die ECL-Detektion konjugiert, für einen Farbnachweis mit der Alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt oder mit einem fluoreszierenden Marker (IRDye *infrared dyes*; LICOR Odyssey) gekoppelt. Vor der Detektion wurde erneut dreimal mit TBS-T Puffer für je 10 min gewaschen.

### Nachweis mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)

Puffer und Reagenzien	
Lösung A	5 mM Luminol; 0.8 mM p-Cumarsäure; 200 mM Tris-HCl, pH 8.5 Pipettierschema: 300 $\mu\text{l}$ Luminol (250 mM in DMSO) 133.5 $\mu\text{l}$ p-Cumarsäure (90 mM in DMSO) 1 ml Tris-HCl, pH 8.5 mit Aqua bidest. auf 15 ml auffüllen (sterilfiltriert)
Lösung B	0.0183 % $\text{H}_2\text{O}_2$ Pipettierschema: 9.15 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ (30% v/v) mit Aqua bidest. auffüllen (sterilfiltriert)
Waschlösung	0.5 M Tris-HCl, pH 7.5
Kodak GBX developer and replenisher	Röntgenfilm-Entwickler bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kodak GBX fixer	Röntgenfilm-Fixier bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hyperfilm ECL <sup>TM</sup>	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Hypercassette <sup>TM</sup>	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Zur Detektion wird die Peroxidase-Aktivität der HRP ausgenutzt. Das Substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird durch die HRP umgesetzt und liefert dabei Elektronen zur Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems von chemilumineszentem Luminol. Dadurch wird Licht emittiert, welches mit Hilfe eines Films nachgewiesen werden kann.

Für die ECL-Detektion wurde ein HRP-konjugierter, sekundärer Antikörper verwendet. Vor der Detektion wurde die Membran nochmals für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen und abschließend für 5 min in 0.5 M Tris-HCl-Lösung, pH 7.5 äquilibriert. Die Detektionslösungen A und B wurden gemischt und durch einen 0.22  $\mu\text{m}$  Sterilfilter direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Membran luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie (Plastibrand® Entsorgungsbeutel, Brand) eingeschweißt. Die Detektion der enzymatischen Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte in einer Hypercassette<sup>TM</sup> durch direktes Auflegen eines ECL-Hyperfilms auf die Membran. Der Film wurde abhängig von der Signalstärke unterschiedlich lange (10s bis 15 min) exponiert. Anschließend wurden die Filme mit Kodak GBX Entwicklerlösung entwickelt und nach einem Waschschrift in mit wenig Essigsäure versetztem Wasser mit Kodak GBX Fixierlösung fixiert.

### Nachweis mittels Farbreaktion (Alkalische Phosphatase)

Puffer und Reagenzien	
Entwicklerlösung	100 mM Tris-HCl, pH 9.7; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BCIP-Lösung	5% (w/v) BCIP in 100% DMF
NBT-Lösung	7.5% (w/v) NBT in 100% DMF
Färbelösung	Pipettierschema: 33 µl BCIP-Lösung; 44 µl NBT-Lösung in 10 ml Entwicklerlösung
Stopp-Lösung	10 mM Na-Phosphat: 915 µl Sorensen's Phosphatpuffer A + 585 µl Sorensen's Phosphatpuffer B; 5 ml Essigsäure aufgefüllt auf 30 ml Aqua bidest.

Die Alkalische Phosphatase (AP) besitzt ihre höchste Enzymaktivität im alkalischen Milieu bei pH 9.7. Die enzymatische Umsetzung ihrer farblosen Substrate BCIP und NBT zu einem blauen, bzw. braunem Farbniederschlag ermöglicht eine gut sichtbare, immunologische Detektion der Proteine auf der Membran. Durch die pH-Änderung, bei Überführung der Membran in die Stopp-Lösung, wird die enzymatische Aktivität der AP stark herabgesetzt und somit eine weitere Färbung verhindert.

Für den Farbnachweis des sekundären AP-konjugierten Antikörpers wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift zunächst für 1-5 min in Entwicklerlösung äquilibriert. Die folgende Inkubationszeit der Membran in der Färbelösung lag bei 1-5 min. Nach dem Erscheinen der spezifisch gefärbten Proteinbanden auf der Membran wurde die Entwicklung durch Überführung der Membran in Stopp-Lösung beendet.

### Nachweis mittels Fluoreszenz markierten Antikörpern (LICOR Odyssey)

Die Kopplung von sekundären Antikörpern mit fluoreszierenden Farbstoffen (IRDye<sup>®</sup> infrared dye, LICOR Biosciences GmbH, Bad Homburg) ermöglicht einen nicht enzymatischen Nachweis Membran-gebundener Proteine. Hierbei emittiert der sogenannte IR-Farbstoff (IRDye700, bzw. IRDye800) nach Anregung durch spezifische Wellenlängen (689 nm und 778 nm) Fluoreszenz im Rot- und Grünbereich des Spektrums. Diese Fluoreszenzemission ermöglicht unter zur Hilfenahme des LICOR Odyssey Gerätes die Detektion des gewünschten Proteins. Diese Methode ermöglicht nicht nur die parallele Inkubation mit zwei verschiedenen primären Antikörpern durch die Verwendung zwei unterschiedlich fluoreszierender sekundärer Antikörper ohne *Strippen* der Membran, sondern vereinfacht auch die anschließende Quantifizierung.

Nach der hintereinander folgenden Inkubationen der beiden primären Antikörper für je 1h bei RT und anschließend 3x Waschen mit TBS-T Puffer für je 10 min wurde die Membran gleichzeitig mit den zwei entsprechenden sekundären, mit IR-Farbstoff gekoppelten Antikörpern für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit TBS-T Puffer für 3x 10 min wurde die Membran mittels LICOR Odyssey Gerät eingescannt und ausgewertet (siehe 3.2.3.13).

### Strippen der Membran

Puffer und Reagenzien	
Stripping-Puffer	62.5 mM Tris-HCl; 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 2% (v/v) SDS

Die ECL-Detektion mittels HRP hat zum Vorteil, das sie sowohl sensitiver als die AP-Farbreaktion wie auch als der fluoreszenzmarkierte Antikörpernachweis ist. Da in dem Fall jedoch eine gleichzeitige Detektion zweier unterschiedlicher Primärantikörper nicht möglich ist, muss die Membran zunächst zur Wiederverwendung von den bereits gebundenen Antikörpern befreit werden, um einen erneuten immunologischen Nachweis mit einem anderen primären Antikörper vornehmen zu können.

Dazu wurde der *Stripping*-Puffer für 5 min in einem 60°C warmen Wasserbad vorgewärmt und die Membran anschließend im *Stripping*-Puffer für 20 min bei 60°C inkubiert. Dies diente der Loslösung aller gebundenen Antikörper. Danach wurde die Membran 3x je 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen und die Proteine konnten anschließend durch einen anderen primären Antikörper erneut immunologisch detektiert werden. Eine Membran lieferte jedoch in der Regel nach dreimaligem *Strippen* keine guten Signale mehr.

### Farbnachweis mittels Ponceau Red

Puffer und Reagenzien	
Färbelösung	0.2 % (w/v) Red Ponceau (Roth, Karlsruhe); 3% TCA (v/v)
Waschlösung	1% (v/v) Essigsäure

Um nachzuprüfen ob auf der Membran nach dem *Strippen* immer noch Proteine gebunden sind kann die Membran mit Ponceau Red angefärbt werden.

Dazu wurde die Membran in der Färbelösung für ca. 5-10 min inkubiert und anschließend mehrmals in der Waschlösung gewaschen zum Entfernen des rote Farbhintergrundes. Danach wurden die nun rot gefärbten Proteinbanden, falls nach dem *Strippen* noch vorhanden, auf der Membran deutlich sichtbar.

### 3.2.3.8 Nachweis radioaktiv markierter Proteine

Der Nachweis bzw. die Visualisierung radioaktiv markierter Proteine unter Verwendung radioaktiver Isotope erfolgte als Autoradiographie oder Radiographie (häufige Abkürzung AURA). Mit Hilfe eines Strahlungsdetektors wurde dabei das inkorporierte Isotop zum Nachweis des rekombinanten Proteins detektiert. Die dabei erhaltene Aufnahme wird auch Autoradiogramm genannt. In dieser Arbeit wurde das Isotop  $^{35}\text{S}$ -Methionin (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) benutzt. Nach Transkription und Translation, unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -Methionin, der verschiedenen Proteine mit Hilfe des TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Mannheim; siehe 3.2.3.2.4) wurden Aliquots dieser

Reaktionen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Gel getrocknet und nach entsprechender Inkubation in einer Radioaktiv-Kassette wurde diese *Phosphorimager*-Platte mit Hilfe des Storm 860 Phosphorimagers detektiert (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

### 3.2.3.9 Proteinreinigungen

#### Aufreinigung von Proteinen über Affinitätschromatographie

Überexprimierte Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei kamen verschiedene Affinitätsmatrixen, je nach verwendetem Tag der rekombinanten Proteine, zum Einsatz. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Volumen des aufzureinigenden, löslichen Proteinextraktes (Lysat) wurde entweder im sogenannten *Batch*-Verfahren oder mit Hilfe des *ÄKTA-Purifier* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gearbeitet.

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch Verwendung drei verschiedener Tag-Systeme: das *Maltose-Binding-Protein*, das His- und das Strep-Tag System.

Beim *Maltose-Binding-Protein* Tag-System wird das rekombinante Protein als Fusion mit dem *E.coli* eigenen *Maltose-Binding-Protein* (MBP) überexprimiert und zur Proteinreinigung dessen Affinität zu Maltose ausgenutzt. Das rekombinante Fusionsprotein bindet an eine quervernetzte Amylose-Matrix und kann nach erfolgter Bindung an die Affinitätssäule mit Maltose eluiert werden. Durch eine integrierte spezifische Erkennungssequenz für die Protease *Faktor Xa* kann der Tag abschließend abgespalten werden. Ein Vorteil dieses Tag-Systems ist die erhöhte Löslichkeit des überexprimierten Fusionspartners. Ein Nachteil ist die Größe des MBP-Tags von ca. 40 kDa im Vergleich zu den anderen beiden nachfolgend erläuterten Systemen.

Beim His-Tag System beruht die Aufreinigung auf einer Metallionen-Affinitätschromatographie, wobei die Histidinreste einen Chelatkomplex mit bivalenten Kationen, wie z.B. Nickel, eingehen können. Die Fusion der rekombinanten Proteine mit einem sechsfachen Histidin-Tag (6x His-Tag) ermöglichte eine Bindung an eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Nitrilotriacetat (NTA)-Affinitätsmatrix (Sephacrose CL-6B). Die abschließende Elution der Proteine erfolgte mit Imidazol. Imidazol kompetetiert durch seine Strukturähnlichkeit mit Histidin um die  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinationsstellen und verdrängt bei Erhöhung der Konzentration die zuvor gebunden Histidinmoleküle aus ihrer Bindung. Ein Vorteil ist der relativ kleine 6x His-Tag. Ein Nachteil ist dass der Anteil an unspezifischer Bindung hoch ist, da auch histidinhaltige Proteine wie auch Metalloproteasen binden können.

Beim Strep-Tag System wird die hohe Affinität eines kurzen Peptides, bestehend aus den Aminosäuren „WSHPQFEK“, zu Streptavidin ausgenutzt. Das hier verwendete *Strep-Tag II*-

System benutzt Strep-Tactin, eine Variante von Streptavidin, als Affinitätsmatrix. Die Elution erfolgt durch Biotin-Analoga wie Desthiobiotin. Da auch die Bindung Biotinähnlicher Proteine, wie z.B. das *biotin-carboxyl-carrier-Protein* (BCCP) aus *E.coli*, möglich ist, muss das Lysat vor dem Laden auf die Säule mit Avidin vorbehandelt werden, um „natürliches“ Biotin zu blocken bzw. auszufällen.

### Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit dem *Batch*-Verfahren

Puffer und Reagenzien	
Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit Strep-Tag	
Affinitätsmatrix (StrepTactin)	Immobilisierte Strep-Tactin Sepharose 4FF, 4% Agarose; 50% Suspension in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; IBA GmbH, Göttingen
Avidin Lösung	1 mg/ml in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
Waschpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
Elutionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 2.5 mM Desthiobiotin
Regenerationspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 1 mM HABA
Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit 6x His-Tag	
Affinitätsmatrix Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Sepharose CL-6B, 6% Agarose; 50% Suspension in 30% Ethanol aufgeladen mit Ni <sup>2+</sup> ; QIAGEN GmbH; Hilden
Waschpuffer	100 mM Na-Phosphat: 42 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 8 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 250 mM NaCl; 20 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 10 mM Imidazol
Elutionspuffer	100 mM Na-Phosphat: 42 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 8 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 600 mM NaCl; 20 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 250 mM Imidazol
Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit MBP-Tag	
Affinitätsmatrix	Quervernetzte Amylose; New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Waschpuffer	50 mM Na-Phosphat: 42 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 8 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 200 mM NaCl; 20 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 1 mM EDTA
Elutionspuffer	50 mM Na-Phosphat: 42 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 8 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 200 mM NaCl; 20 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 1 mM EDTA, 10 mM Maltose

Nach Lyse der *E.coli* Zellen bzw. Sf21 Insektenzellen und Extraktion der löslichen Proteinfraction (siehe 3.2.3.3) wurden bei kleineren Lysatvolumina die rekombinanten Proteine im *Batch*-Verfahren aufgereinigt.

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Strep-Tag wurde das Lysat zunächst mit einer Avidin-Lösung versetzt, für 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert und anschließend bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert. Der die löslichen Proteine enthaltene Überstand wurde mit 0.22  $\mu$ m Sterilfiltern gefiltert, ein Aliquot von 100  $\mu$ l entnommen und in neue 15 ml Reaktionsgefäße (Falcon) überführt.

Nach Zugabe von 250  $\mu$ l Affinitätsmatrix Suspension (Strep-Tactin) wurde das Gemisch zur Proteinbindung für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert um eine Sedimentation der Matrix zu



verhindern. Anschließend wurde das Matrix-Proteinextrakt-Gemisch in eine *gravity-flow* Säule überführt und 100 µl des Durchflusses als Aliquot aufbewahrt. Die Säule wurde 5-mal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen und ein 100 µl Aliquot der Waschfraktion aufbewahrt. Das rekombinante Protein wurde in 5 Schritten mit je 100 µl Elutionspuffer von der Matrix eluiert. Ein Aliquot des Eluates und die entnommenen Aliquots der vorherigen Fraktionen dienten der Kontrolle der Aufreinigung über SDS-PAGE. Abschließend wurde der Rest des Eluates ankonzentriert und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine mit einem 6x His-Tag wurde die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose verwendet. Dazu wurde der löslichen Proteinfraction nach Filtern mit einem 0.22 µm Sterilfilter 500 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Suspension hinzugefügt und für 1 h in einer *gravity-flow* Säule bei 4°C rotierend inkubiert. Vom Durchfluss wurde ein 100 µl Aliquot aufbewahrt. Anschließend wurde 4-mal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und ebenfalls ein 100 µl Aliquot entnommen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte in 4 Schritten mit je 250 µl Elutionspuffer. Die entnommenen Aliquots wie auch ein Aliquot des Eluates wurden mittels SDS-PAGE analysiert, der Rest des Eluates ankonzentriert und für die weitere Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels des MBP-Tag System wurde das Lysat nach Zugabe von 1 ml Amylose-Matrix 1 h rotierend bei 4°C in einer *gravity-flow* Säule inkubiert. Anschließend wurde die Säule geöffnet und 100 µl des Durchflusses als Aliquot zur späteren Analyse aufbewahrt. Nach 5-maligem Waschen mit je 2 ml Waschpuffer wurden die rekombinanten Proteine durch dreimalige Zugabe von 300 µl Elutionspuffer eluiert. Es wurden ebenfalls je 100 µl Aliquots der Wasch- und Eluatfraktionen aufbewahrt. Die Eluate wurden anschließend zusammengeführt, ankonzentriert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit dem ÄKTA Purifier

Puffer und Reagenzien	
Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit 6x His-Tag	
Sorensen's Phosphatpuffer A	200 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
Sorensen's Phosphatpuffer B	200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O



Puffer A1	50 mM Na-Phosphat: 21 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 4 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 200 mM NaCl; 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin
Puffer B1 (500 mM Imidazol)	50 mM Na-Phosphat: 21 ml Sorensen's Phosphatpuffer A + 4 ml Sorensen's Phosphatpuffer B, pH 7.5; 200 mM NaCl; 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 500 mM Imidazol
HisTrap HP 5ml	Säulenvolumen 5.027 ml; Höhe 2.5 cm, Ø 1.6 cm, Affinitätschromatographie, Max. Druck 0.3 MPa (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit Strep-Tag	
Strep-Tactin MacroPrep	Säulenvolumen 5 ml; Höhe 6.3 cm, Ø 2.4 cm, Affinitätschromatographie, Max. Druck 2 MPa (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
Avidin Lösung	1 mg/ml in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
Waschpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
Elutionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 2.5 mM Desthiobiotin
Regenerationspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 1 mM HABA

Nach der Überexpression und anschließenden Extraktion der löslichen Proteinfraction aus *E.coli* wurden die Proteine mit Hilfe des *ÄKTA-Purifier* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgereinigt.

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine mit 6x His-Tag wurde die HisTrap HP 5 ml Säule vor dem Beladen des Lysates mit 5 Säulenvolumen mit Puffer A1 und einer Endkonzentration von 10 mM Imidazol äquilibriert um eine unspezifische Proteinbindung zu verringern. Das Lysat wurde zuvor mit einem 0.22  $\mu$ m Sterlfilter gefiltert, um mögliche Proteinaggregate zu entfernen. Nach dem Laden des Lysates auf die Säule wurden zunächst durch mehrere Waschschrte mit 40 mM Imidazol unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution der rekombinanten Proteine mit einer Fraktionsgröße von 1 ml erfolgte durch Erhöhung der Imidazolkonzentration entweder durch einen kontinuierlich ansteigenden Imidazolkonzentrations-Gradienten bis zu einer Endkonzentration von 500mM oder über einen Stufengradienten, indem die Imidazolkonzentrationen (30 mM; 160 mM, 250mM, 500 mM) diskontinuierlich erhöht wurden. Die unterschiedlichen Äquilibrierungs-, Wasch- und Elutionspuffer wurden durch Mischen der beiden Puffer A1 und B1 in verschiedenen Verhältnissen hergestellt.

Bei der Nutzung des Strep-Tag II Systems wurde die Strep-Tactin MacroPrep 5 ml Säule mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert und das zuvor mit Avidin behandelte und gefilterte Lysat auf die Säule geladen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 3 Säulenvolumen mit einer Fraktionsgröße von 1 ml. Nach der Aufreinigung wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Regenerationspuffer äquilibriert und bis zur weiteren Verwendung in diesem Puffer aufbewahrt.

### Entsalzung und Ankonzentrierung von Proteinlösungen

#### Puffer und Reagenzien

Lagerungspuffer	10mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin
Membrankonzentrator	Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K NMWL, 15 ml ; Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 10K NMWL, 4 ml; Millipore, Bedford, MA, USA
Membrankonzentrator	Vivaspin 500 $\mu$ l Ultrafiltration spin columns, 30.000 MWCO (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen)

Zur Ankonzentrierung und zum Entsalzen von Proteinlösungen wurden diese je nach Volumen in entsprechende Membrankonzentratoren überführt und mehrfach bei 4000 x g und 4°C für 30 min bis zu 1 h zentrifugiert. Dadurch wurden niedermolekulare Substanzen mit einer Ausschlußgröße von  $\leq 30$  bzw 10 kDa entfernt und das Lösungsvolumen verringert. Die Entsalzung oder Umpufferung erfolgte hierbei durch mehrmaliges Verdünnen der Lösung mit gewünschtem Puffer, gefolgt von erneuter Ankonzentrierung. Die Proteinlösungen wurden danach bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### Größenausschlusschromatographie

Puffer und Reagenzien	
Laufpuffer	10mM Tris-HCL; pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin
Superdex 200 10/300 GL	Säulenvolumen 7.77 ml; Höhe 30 cm; Max. Druck 1.5 MPa; Max. Flussrate 0,8 ml/min; GE Healthcare Europe GmbH, München

Die Gelfiltration bzw. Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Medium. Sie wird oft genutzt zur Reinigung von Proteinlösungen bzw. zur Separation von Proteingemischen wie auch zur genauen Größenbestimmung von Proteinen. Das Prinzip der Auftrennung beruht auf der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen im Gelkompartiment in Abhängigkeit von ihrer Größe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Größenbestimmung des rekombinanten Fusionsproteins FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2-Strep genutzt. Nach Eichung bzw. Kalibrierung der Säule mit entsprechenden Standards (Gel Calibration Kits; GE Healthcare Europe GmbH, München) wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert und anschließend 10  $\mu$ g des ankonzentrierten Proteins geladen. Die Bestimmung der tatsächlichen Molekülgröße wurde durch den Vergleich mit den Laufgeschwindigkeiten der Standardproteine ermittelt.

#### 3.2.3.10 Nachweis von Protein-Protein-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation

Puffer und Reagenzien	
Dynabeads® Protein G	Immuoprecipitation Kit-Dynabeads® Protein G, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Binding/Wash Puffer	

Wash Puffer	
Complete EDTA-free protease-inhibitors	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Reaktionspuffer	200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% Tween-20 + <i>Complete EDTA-free protease-inhibitors</i>
5 x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6.8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau

Die Immunopräzipitation (IP) bietet die Möglichkeit Proteine über einen Affinitäts-Tag oder mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Peptid aus einer Lösung bzw. Proteinextrakt zu entfernen (*Pull-down*). Diese Methode kann auch als Nachweis von Protein-Protein-Interaktion *in vitro* genutzt werden, auch als CO-Immunopräzipitation (CO-IP) bezeichnet. Hierfür wird zunächst das *bait*-Protein, das einen Affinitätstag besitzt, mit Hilfe eines Antikörpers an eine Matrix gebunden. Das zweite *prey*-Protein ohne Affinitätstag bindet dann nur im Fall einer Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen an die Matrix. Können beide Proteine anschließend gebunden an die Matrix im Pellet nachgewiesen werden, bestätigt dies ihre Interaktion *in vitro*.

Für die Co-IP wurden 50 µl von Dynabeads® Protein G mit 2,5 µg monoklonalem His-Tag Antikörper in *Binding/Wash* Puffer für 1 h bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 250 µl rotierend inkubiert. Parallel wurden 10 µl *prey*-Protein aus jeder der einzelnen TnT-Reaktion (siehe 3.2.3.2.4) mit oder ohne *bait*-Protein (His-CRY2 bzw. His-PHR) in 100 µl Reaktionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die *magnetic beads* 3 x mit 200 µl *Wash* Puffer gewaschen und jedes *prey*-Protein Aliquot (mit oder ohne entsprechendem *bait*-Protein) wurde entsprechend zu den vorher inkubierten Proben gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h rotierend bei 4°C wurden die Proben 3 x mit 200 µl *Wash* Puffer gewaschen und anschließend in 25 µl 1x SDS Probenpuffer durch Aufkochen bei 95°C für 5 min resuspendiert. Die CO-IP Fraktionen und zur Kontrolle 2 µl jeder TnT Reaktion wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels *Phosphorimager* (Storm 860 Molecular Dynamics, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg; siehe 3.2.3.8) visualisiert.

### 3.2.3.11 Dephosphorylierung durch Behandlung mit Lambda Protein Phosphatase ( $\lambda$ -PP Phosphatase)

Reaktionspuffer bzw. Extraktionspuffer	100mM Tris-HCl; pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 5% (v/v) Glycerin; 1% Igepal-C-630 + (1x) <i>Complete EDTA-free protease-inhibitors</i> ; 10 mM Benzamidin in Aqua bidest.; 14 $\mu$ M E-64 in Aqua bidest.; 8,8 $\mu$ M Pepstatin A in 90% (v/v) Methanol + 10% (v/v) Essigsäure; 4,5 mM PMSF in 99% Ethanol
$\lambda$ -PP Phosphatase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Phosphatase Inhibitor	Sodium Orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ); New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Complete EDTA-free protease-inhibitors	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5 x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6.8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau

Nach der Extraktion der löslichen Proteinfraction aus Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* mit oder ohne Blaulichtbelichtung, wurden die Fraktionen ( $[c]=20 \mu\text{g}$ ) nach der Konzentrationsbestimmung entweder mit oder ohne  $\lambda$ -PP Phosphatase bzw. mit  $\lambda$ -PP Phosphatase und einem Inhibitor ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) behandelt. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion mittels Zugabe von 1x SDS Probenpuffer und Aufkochen für 10 min bei 95°C gestoppt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen auf einem SDS-Gel aufgetragen und nach Western-Transfer immunologisch ausgewertet und miteinander verglichen. Die Aktivität der  $\lambda$ -PP Phosphatase wurde vor dem Versuch spektroskopisch überprüft. Alle Reaktionen wurden unter Sicherheitslicht durchgeführt.

### 3.2.3.12 Proteasom Inhibition

Der Nachweis einer blaulichtabhängigen, proteasomalen Proteindegradation von Cryptochrom 2 erfolgte durch Analyse der Proteinmengen von CRY2 aus Keimlingen, die vor der Blaubelichtung mit Proteasom Inhibitoren behandelt wurden. Dafür wurden Keimlinge nach der Stratifikation von 96 h im Dunkeln bei 4°C für weitere 2 h dunkel mit oder ohne entsprechenden Proteasom Inhibitoren (ALLN, MG132, MG115, PS1 alle Merck KGaA, Darmstadt; je 50  $\mu\text{M}$  gelöst in 2% (v/v) DMSO) inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation der Keimlinge nur in einer 2%igen (v/v) DMSO-Lösung. Anschließend erfolgte eine Belichtung der Keimlinge für 2 h mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$ ;  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) oder die Keimlinge wurden 2 h zur Kontrolle im Dunkeln gehalten. Abschließend wurden die Keimlinge mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Extraktion der Proteine erfolgte über eine TCA/Aceton Fällung (siehe 3.2.3.3.2). Abschließend wurden die Extrakte über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachfolgend durch Western-Blot Transfer auf eine Membran immunologisch nachgewiesen und die Proteinmengen von CRY2 quantitativ verglichen.

### 3.2.3.13 Quantifizierung der CRY2 Proteinmenge mit Hilfe der Li-COR Software

Um eine Aussage über die Stabilität von CRY2 in den verschiedenen untersuchten Linien von *Arabidopsis thaliana* zu machen, erfolgte zunächst der immunologische Nachweis von CRY2 in den Proteinextrakten der verschiedenen untersuchten Pflanzenlinien mit Hilfe des Odyssey Infrarot Image Systems (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg). Die Signalintensitäten der einzelnen Proteinbanden wurden mittels der Software des Systems analysiert, quantifiziert und verglichen.

Dabei wurde die Signalintensität der einzelnen Proteinbanden, die mit der detektierten Proteinmenge korrelierte, von der Software in absoluten Werten ausgedrückt unter Berücksichtigung des vorherrschenden Hintergrundes.

Auf diese Weise wurden sowohl die Signalintensitäten des CRY2, wie auch des Tubulin-Signals quantifiziert. Die Signalintensität des jeweiligen entsprechenden Tubulin-Signals diente hierbei als interne Ladekontrolle der für SDS-Gelelektrophorese verwendeten Proteinmenge der verschiedenen Proteinextrakte. Um die Abnahme der Signalstärke bzw. Proteinmenge von CRY2 zur jeweiligen Dunkelkontrolle in Bezug zu setzen und somit die prozentuale Abnahme von CRY2 Protein in den einzelnen untersuchten Pflanzenlinien zu vergleichen wurde folgende Formel verwendet.

Formel:  $(CRY2_b/Tubulin_b) / (CRY2_0/Tubulin_0) = \text{relativer Proteingehalt von CRY2}$

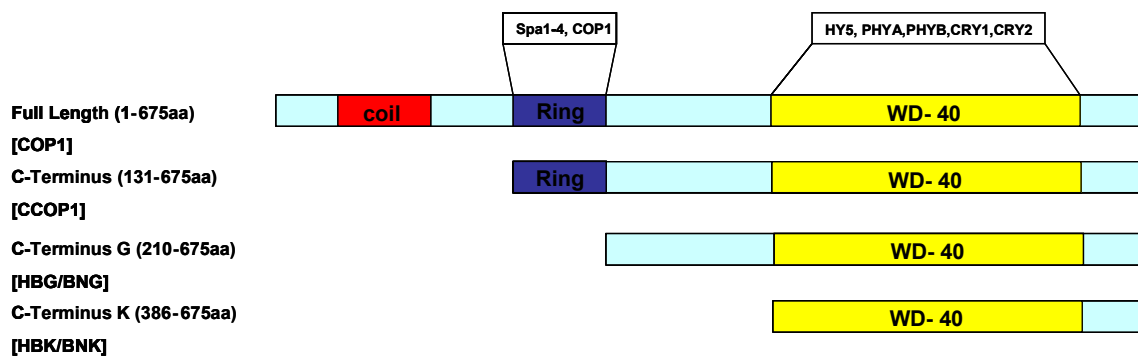
Die ermittelten und auf das Tubulin-Signal normalisierten Werte für die verschiedenen Zeitpunkte bzw. getesteten Fluenzraten wurden in prozentualem Bezug zu dem Wert der jeweiligen Dunkelkontrolle gebracht, wobei diese auf 100% gesetzt wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Expression von Proteinen

#### 4.1.1 Expression und Aufreinigung von COP1-Konstrukten

Für nachfolgende geplante Struktur-Untersuchungen und *in vitro* Interaktionsstudien sollte ein möglicher Interaktionspartner des Photorezeptors Cryptochrom 2 in ausreichender Menge exprimiert und aufgereinigt werden. Ausgehend von Literaturdaten (Yang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Sang *et al.*, 2005) wurde der Repressor der Photomorphogenese *CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1* (COP1) ausgewählt. Es ist in der Literatur beschrieben, dass COP1 mit dem C-Terminus von CRY2 lichtunabhängig interagiert. So könnte COP1 als Stabilisator der Struktur des flexiblen C-Terminus von Cryptochrom 2 (Partch *et al.*, 2005) fungieren, was für die Strukturaufklärung dieser Domäne sehr wichtig wäre. Ferner war geplant den Interaktionspartner COP1 für *in vitro* Interaktionsstudien mit CRY2 über Co-Immunopräzipitations-Analysen zu nutzen. Es wurden verschiedene Konstrukte von COP1 bzw. COP1 Fragmenten hergestellt. Im Folgenden sind nur die generierten Konstrukte dargestellt (Abb.4.1), die nach Analyse ihrer Expressionskinetik vielversprechende Ergebnisse zeigten und somit für eine anschließende Aufreinigung im Großmaßstab in Frage kamen (siehe auch Anhang A1 A).



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung der generierten COP1 Konstrukte.** Die Abbildung zeigt die Domänen des COP1 Proteins und deren jeweilige Bedeutung für die Interaktion mit unterschiedlichen Photorezeptoren bzw. Transkriptionsfaktoren. Angegeben sind die jeweiligen Größen der generierten rekombinanten Proteine in Anzahl der Aminosäuren und die intern verwendete Bezeichnung.

Nach PCR-Amplifikation und Ligation der generierten Konstrukte in die entsprechenden Zielvektoren erfolgte die Verifizierung der korrekten Basenabfolge über eine Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz). Nach der Transformation in unterschiedliche *E. coli* Expressionsstämme wurden die jeweiligen optimalen Proteinexpressionsbedingungen für die einzelnen COP1 Konstrukte durch Vorversuche ermittelt. In diesen wurden verschiedene Expressionszeiten, Temperaturen und Medien getestet. In der nachfolgenden Tabelle 4.1 sind die COP1-Konstrukte aufgeführt, die in den Optimierungsansätzen im

Kleinmaßstab eine Expression des rekombinanten Proteins in löslicher Form zeigten und daher für eine darauffolgende Expression im Großmaßstab und anschließende Aufreinigung über Affinitätschromatographie eingesetzt wurden.

Konstrukt	Proteinkonzentration nach Aufreinigung	Verwendetes Verfahren zur Aufreinigung über Ni <sup>2+</sup> -NTA Matrix	Expressionsbedingungen
C-Terminus [CCOP1]	3,37 µg/µl; 500 µl	ÄKTA Purifier mittels Affinitätschromatographie über eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix	Vektor pACYC-Duet <sup>1</sup> (6x His-Tag); <i>E. coli</i> Stamm BL21(DE3); Kulturvolumen 6 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 6 h; Temp. 30°C; 200 rpm
Full length [COP1]	0,89 µg/µl; 250 µl	Batch-Verfahren mittels Maltose-gekoppelter G-Agarose in <i>gravity flow</i> Säulen	Vektor pMAL-c (MBP-Tag); <i>E. coli</i> Stamm TB1; Kulturvolumen 3 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 5 h; Temp. 37°C; 200 rpm
C-Terminus G [HBG]	11,34 µg/µl; 900 µl	ÄKTA Purifier mittels Affinitätschromatographie über eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix	Vektor pQE30 (6x His-Tag); <i>E. coli</i> Stamm M15 [pREP4]; Kulturvolumen 6 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 4h; Temp. 37°C; 200 rpm
C-Terminus K [BNK]	2,3 µg/µl; 500 µl	ÄKTA Purifier mittels Affinitätschromatographie über eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix	Vektor pQE60 (6x His-Tag); <i>E. coli</i> Stamm M15 [pREP4]; Kulturvolumen 4 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 6 h; Temp. 30°C; 200 rpm

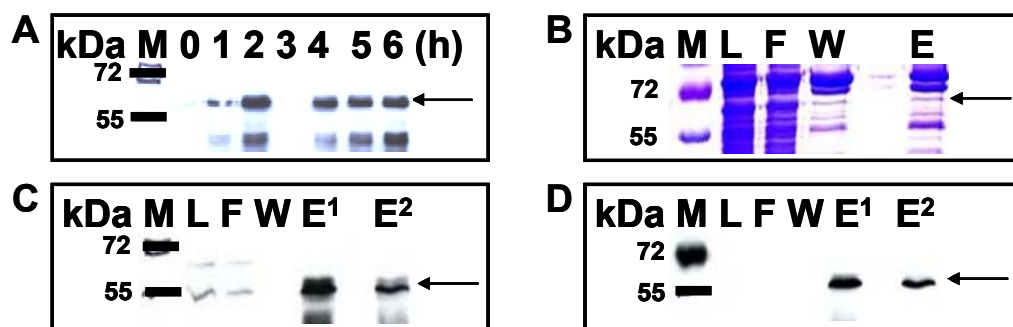
**Tabelle 4.1: Übersicht über die Aufreinigung verschiedener COP1 Konstrukte.**

Die vollständige Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukte von COP1 zur Expression in *E. coli*, sowie die verschiedenen analysierten Expressionsbedingungen sind im Anhang A2 A und A2 B aufgelistet. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse der Expression und Aufreinigung der verschiedenen COP1 Konstrukte beziehen sich auf die in der Tabelle 4.1 aufgelisteten Expressionsbedingungen und chromatographischen Aufreinigungsverfahren nach dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll (Kapitel 3.2.3.9.3).

#### Expression und Aufreinigung von CCOP1

In Abb. 4.2 ist die Expressionskinetik und die Aufreinigung des C-terminalen COP1 (CCOP1) Proteins dargestellt. In der Immunodetektion der löslichen Proteinfraction (Abb. 4.2 A) war die Induktion der Proteinexpression nach Zugabe von IPTG bereits nach 1 h deutlich zu erkennen. Eine Anreicherung von CCOP1 konnte anhand der sich stärker ausprägenden Bande in erwarteter Laufgröße von 57 kDa über die Expressionszeit beobachtet werden. Die fehlende Detektion des rekombinanten Proteins in Probe 3 h ist auf einen Pipettierfehler zurückzuführen. Die Immunodetektion der einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung von CCOP1 zeigte eine Anreicherung des rekombinanten Proteins in den Eluatfraktionen E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> nach Ni-NTA Aufreinigung im Vergleich zur Lysatfraktion L (Abb. 4.2.C und D). Jedoch

zeigte die Coomassie-Färbung der Fraktionen der Proteinreinigung (Abb. 4.2 B) eine geringe Menge des rekombinanten CCOP1 im Verhältnis zu anderen *E.coli* eigenen Proteinen in den Eluatfraktionen und verdeutlicht somit den geringen Reinheitsgrad der Proteinaufreinigung. Die Immunodetektion mit  $\alpha$ COP1-Antiserum (Abb.4.2 C) bzw.  $\alpha$ His-Antiserum (Abb.4.2 D) zeigte zudem eine beginnende Degradation des rekombinanten Proteins CCOP1. Durch Verwendung eines größeren Kulturvolumens (12 L) konnte die Ausbeute wie auch der Reinheitsgrad des rekombinanten CCOP1 im Eluat nicht erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Reinheit und Proteinmenge kam CCOP1 für die geplante Co- Kristallisation von CRY2 mit COP1 nicht in Frage, war jedoch ausreichend für Co-Immunopräzipitations-Analysen von CCOP1 mit dem C-Terminus von CRY2.



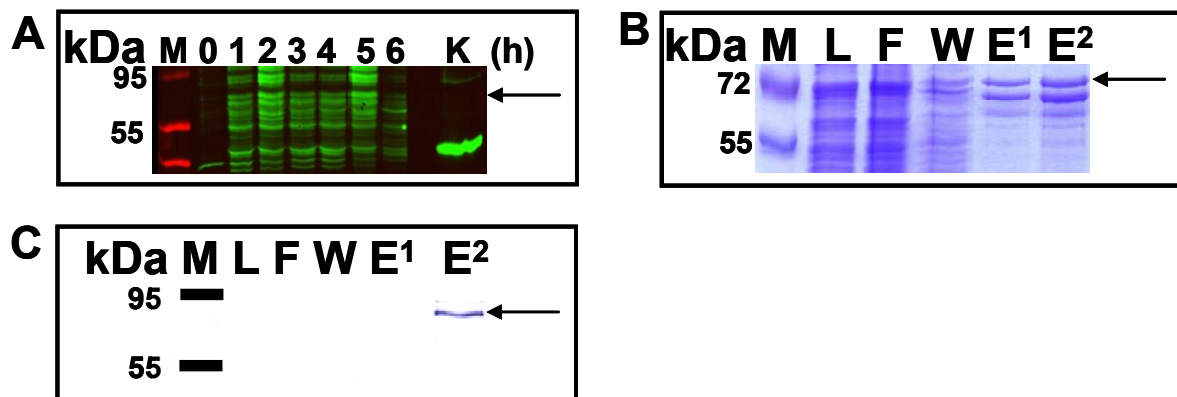
**Abb. 4.2: Expression und Aufreinigung von CCOP1 in pACYC-Duet-1 aus *E. coli* BL21(DE3).** **A** ECL-Immunodetektion der löslichen Proteinfraction mit  $\alpha$ His-Antiserum über die Expressionszeit. **B** SDS-Gel der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung. **C** ECL-Immunodetektion der Fraktionen der Ni-NTA chromatographischen Proteinreinigung mit  $\alpha$ COP1 und **D**  $\alpha$ His-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins CCOP1 (57 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *PageRuler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat.

### Expression und Proteinreinigung von COP1

Das Volllängenprotein (*full-length*) COP1 Konstrukt mit einem N-terminalem MBP-Tag (*maltose-binding-protein*) wurde von Albrecht G. von Arnim zur Verfügung gestellt.

Die in Abb. 4.3 A dargestellte Immunodetektion der löslichen Proteinextrakte zeigten neben der Induktion der Proteinexpression von COP1 zum Zeitpunkt 1 h auch die unspezifische Detektion vieler verschiedener Proteine durch das  $\alpha$ MBP-Antiserum. Dies resultierte entweder aus einer möglichen Proteindegradation von COP1 oder bereits aus einer fehlerhaften Expression des rekombinanten Proteins. Die in Abb. 4.3 B dargestellte Coomassie-Färbung der Fraktionen der Proteinreinigung von COP1, wie auch deren Immunodetektion mit  $\alpha$ MBP-Antiserum (Abb. 4.3 C) zeigten eine Anreicherung des rekombinanten Proteins COP1 in den Eluatfraktionen E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> gegenüber den anderen Fraktionen. Die in der Lysatfraktion L fehlende Immunodetektion von COP1 spricht jedoch für eine geringe Expression des Volllänge COP1 Zielproteins. Auch die erzielte Menge und Reinheit waren nicht ausreichend für weiterführende Experimente.



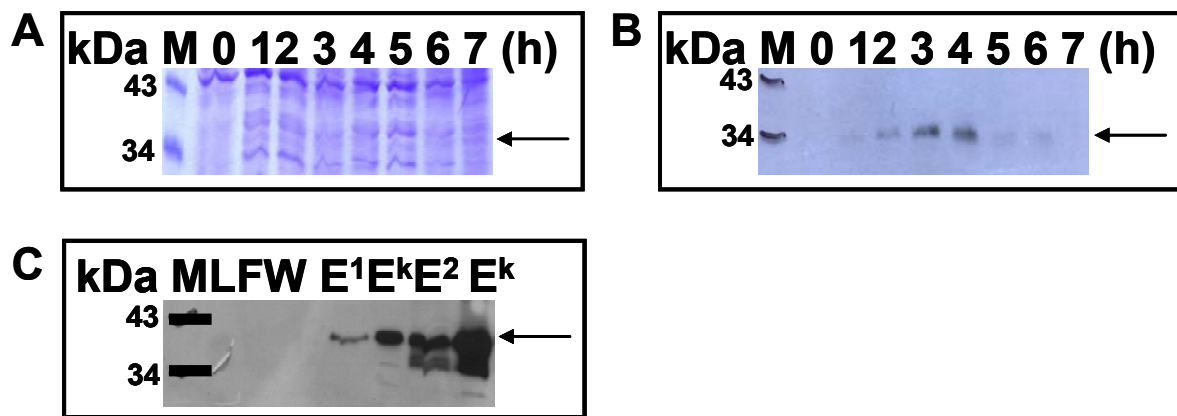


**Abb. 4.3 Expression und Aufreinigung von COP1 in pMAL-C aus *E. coli* TB1.** **A** Immunodetektion der löslichen Proteinfraction mit  $\alpha$ MBP-Antiserum und LI-COR Odyssey über die Expressionszeit. **B** SDS-Gel der Fraktionen der MBP-chromatographischen Proteinreinigung. **C** Immunodetektion der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung mit  $\alpha$ MBP-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins COP1 (ca. 80 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat; K: Kontrolle MBP (*Maltose Binding Protein*).

Aufgrund unzureichender Ergebnisse im Hinblick auf erzielbare Proteinmenge und Reinheit der oben aufgeführten Konstrukte CCOP1 und COP1, wurden weitere verkürzte COP1 Konstrukte hergestellt. Diese bestanden aus dem C-Terminus von COP1, welcher nur die für die Proteininteraktion mit möglichen Partnern notwendige WD-40-Domäne beinhaltet. Die beiden Konstrukte (interne Bezeichnung HBG und BNK) unterschieden sich in ihrer Größe (Abb. 4.1) und wurden jeweils mit N- bzw. C-terminalen (6x)His exprimiert. Im Folgenden sind nur die Ergebnisse der Expression und Proteinreinigung der Konstrukte HBG mit N-terminalem His-Tag bzw. BNK mit C-terminalem His-Tag gezeigt.

#### Expression und Proteinreinigung HBG

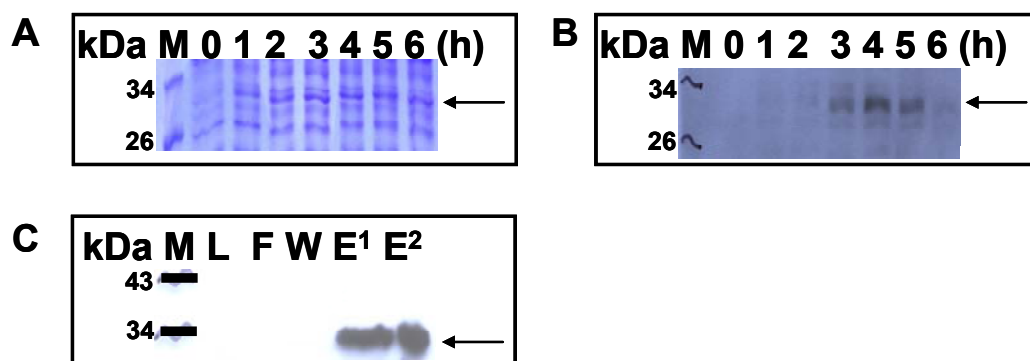
Die Coomassie-Färbung der löslichen Proteinextrakte aus der Expressionskinetik des rekombinanten Proteins HBG (Abb. 4.4 A) zeigte keine ersichtliche Anreicherung in der erwarteten Laufgröße von 36 kDa. Die Expression des Zielproteins HBG wurde jedoch in der Immunodetektion (Abb. 4.4 B) mit  $\alpha$ His-Antiserum bereits 1 h nach IPTG Induktion nachgewiesen. Jedoch war auch eine Abnahme der Bandenintensität nach 4 h Expressionszeit erkennbar, was für eine geringe Stabilität des rekombinanten HBG spricht. Die Analyse der Fraktionen der Proteinreinigung mittels Immunodetektion mit  $\alpha$ His-Antiserum zeigte jedoch eine Anreicherung des Zielproteins HBG (Abb. 4.4 C), wobei auch in diesem Fall der Anteil an *E. coli* eigenen Proteinen in der Eluat Fraktion hoch war (Daten nicht gezeigt). Die erzielte Menge und Reinheit des rekombinanten HBG Proteins war somit nicht ausreichend für weiterführende Experimente.



**Abb. 4.4 Expression und Aufreinigung von HBG in pQE30 aus *E. coli* M15 [pREP4].** **A** SDS-Gel der löslichen Proteinfractionen über die Expressionszeit. **B** Immunodetektion der der Fractionen aus A) mit  $\alpha$ His-Antiserum. **C** Immunodetektion der Fractionen der Ni-NTA chromatographischen Proteinreinigung mit  $\alpha$ His-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins HBG (36 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat; E<sup>k</sup>: Konzentrierte Eluate.

#### Expression und Proteinreinigung von BNK

Die in Abb. 4.5 A dargestellte Coomassie-Färbung der löslichen Proteinextrakte der Expressionskinetik des rekombinanten Proteins BNK zeigte eine Induktion und eine leichte Zunahme der Proteinmenge des Zielproteins in der erwarteten Laufgröße von 31 kDa. Die Immunodetektion der löslichen Proteinextrakte mit  $\alpha$ His-Antiserum (Abb. 4.5 B) konnte die Expression des rekombinanten Proteins BNK bestätigen. Die Expression von BNK konnte 3 h nach IPTG Induktion beobachtet werden, wobei sich jedoch auch ein Abbau des Proteins nach 6 h zeigte. Die Immunodetektion der Fractionen der Proteinreinigung von BNK (Abb. 3.5 C) mit  $\alpha$ His-Antiserum zeigte eine Anreicherung von BNK in den Eluatfraktionen (E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup>) im Vergleich zur Lysat- und Waschfraktion. Die fehlende Detektion von BNK in der

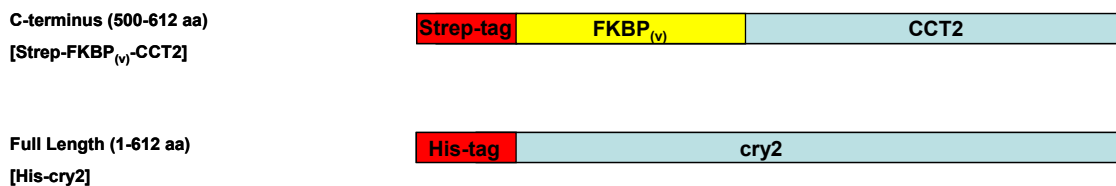


**Abb. 4.5 Expression und Aufreinigung von BNK in pQE60 aus *E. coli* M15 [pREP4].** **A** SDS-Gel der löslichen Proteinfractionen über die Expressionszeit. **B** Immunodetektion der Fractionen aus A) mit  $\alpha$ His-Antiserum. **C** Immunodetektion der Fractionen der Ni-NTA chromatographischen Proteinreinigung mit  $\alpha$ His-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins BNK (31 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat.

Lysatfraktion spricht für eine schwache Expression des rekombinanten Proteins. Der Anteil an *E. coli* eigenen Proteinen in der Eluatfraktion im Verhältnis zum angereicherten BNK war immer noch hoch (Daten nicht gezeigt), so dass der gewünschte Reinheitsgrad des rekombinanten Proteins BNK für weiterführende Experimente nicht ausreichend war.

#### 4.1.2 Expression und Aufreinigung von CRY2-Konstrukten aus *E. coli*

Für eine geplante Co-Kristallisation und *in vitro* Interaktionsstudien von CRY2 mit COP1, sollte CRY2 in ausreichender Menge exprimiert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden zwei Konstrukte hergestellt und, nach Überprüfung der Basenabfolge durch Sequenzierung, auf ihre Expression hin getestet (siehe auch Anhang A1 B). Das erste Konstrukt bestand aus einem N-terminalen Strep-Tag, gefolgt von FKBP<sub>(v)</sub> und dem C-Terminus von CRY2 (CCT2) (Abb. 4.6). Die FKBP<sub>(v)</sub>-Domäne ist Bestandteil des ARGENT™ *Regulated Homodimerization Kit* (ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA). Dieses System beruht darauf, dass bei dem zu untersuchenden Protein die natürliche Dimerisierungs-Domäne durch eine künstliche Dimerisierungs-Domäne ersetzt wird.



**Abb. 4.6 Schematische Darstellung der generierten Konstrukte für die Expression von CRY2 in *E. coli* und Insekten Zellen.** Schematische Darstellung der beiden generierten Cryptochrom 2 Konstrukte mit den jeweiligen Affinitäts-Tags. Angeben sind die jeweiligen Größen der verschiedenen rekombinanten Proteine in Anzahl der Aminosäuren und die intern verwendete Bezeichnung. Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 wurde für die Expression in *E. coli* generiert, His-CRY2 für die Insekten Zell Expression.

Bei den künstlichen Dimerisierungs-Domänen handelt es sich um die Proteine FKBP12 (FK506 bindendes Protein) und FRAP (FKBP Rapamycin assoziiertes Protein) sowie dem Dimerisierer Rapamycin, die *in vivo* normalerweise an der Arretierung des menschlichen Zellzyklus beteiligt sind (Liberles *et al.*, 1997). Das Prinzip beruht auf der Zugabe von einem Inducer (*rapalogs*; Rapamycin Analogon) zu den mit FKBP, bzw. FRAP fusionierten Zielproteinen, wodurch eine chemisch induzierbare Dimerisierung von FKBP<sub>(v)</sub> und somit auch der Zielproteine erzielt wird. Diese Hetero- bzw. Homodimerisierungssysteme konnten bereits erfolgreich für eine lichtunabhängige Dimerisierung der CCT2-Domäne des Photorezeptors CRY2 *in vivo* angewendet werden (Rosenfeldt *et al.*, 2008).

Das Konstrukt Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 wurde für die Expression in *E. coli* generiert und die nachfolgend gezeigten Ergebnisse der getesteten Expressionsansätze im Hinblick auf

Expressionsbedingungen, verwendetes chromatographisches Aufreinigungsverfahren und erzielte Proteinkonzentration sind in der Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Analyse der Expression des Konstruktes Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 unter abgeänderten Bedingungen, wie unterschiedlichen Expressionsvektoren, *E. coli* Stämmen, Expressions-Zeiten und Temperaturen sowie Medien werden hier im Einzelnen nicht näher aufgeführt.

Konstrukt	Proteinkonzentration nach Aufreinigung	Verwendetes Verfahren zur Aufreinigung über Streptactin Matrix	Expressionsbedingungen
C-Terminus [Strep-FKBP-CCT2]	4,35 µg/µl; 700 µl	ÄKTA <i>Purifier</i> mittels Affinitätschromatographie über Streptactin Matrix	Vektor pET 51 b(+) (Strep-Tag); <i>E.coli</i> Stamm BL21(DE3); Kulturvolumen 9 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 4h; Temp. 37°C; 200 rpm
C-Terminus [Strep-FKBP-CCT2]	3,2 µg/µl; 500 µl	<i>Batch</i> -Verfahren mittels Streptactin-Matrix in <i>gravity flow</i> Säulen	Vektor pET 51 b(+) (Strep-Tag); <i>E.coli</i> Stamm M15 [pREP4]; Kulturvolumen 2 Liter in LB-Medium; Expressionszeit 4h; Temp. 37°C; 200 rpm

Tabelle 4.2: Übersicht über die Aufreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2

Die Expression des rekombinanten Proteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 erfolgte bei 37°C in LB-Medium für 4 h. Für die Aufreinigung in einem kleinen Maßstab (*batch* Verfahren) wurden 2 Liter Kulturen angesetzt, für die Aufreinigung im Großmaßstab mit dem ÄKTA-*Purifier* wurde die Expression in einem Kulturvolumen von 9 Litern durchgeführt.

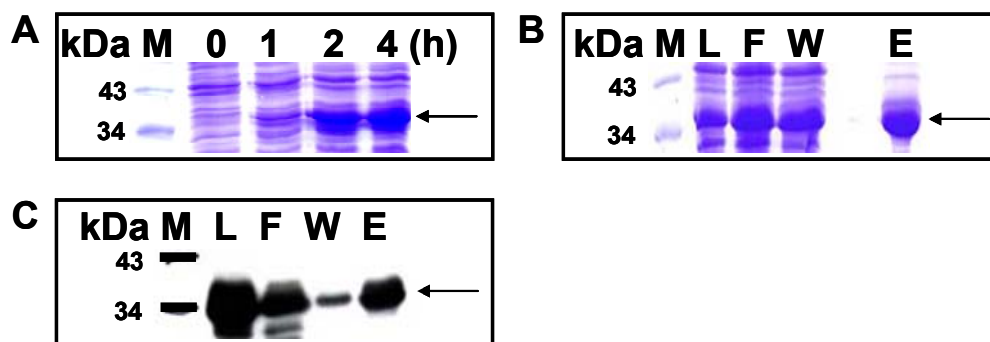
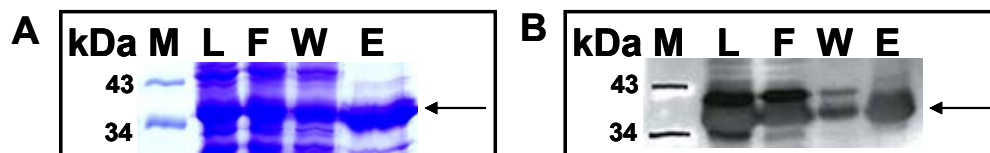


Abb. 4.7 Expression und Aufreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 aus *E. coli* BL21(DE3) im Großmaßstab mittels ÄKTA-*Purifier*. **A** SDS-Gel der löslichen Proteinfraktion über die Expressionszeit. **B** SDS-Gel der Fraktion der chromatographischen Proteinreinigung. **C** Immunodetektion der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung mit  $\alpha$ Strep-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 (36 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat.

Die in Abb.4.7 A dargestellte Coomassie-Färbung der löslichen Proteinfraktion der Expressionskinetik, zeigte eine Induktion der Proteinexpression von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 in der erwarteten Laufgröße von 36 kDa zum Zeitpunkt 1 h wie auch die starke Anreicherung

des rekombinanten Proteins nach bereits 4 h. Die Coomassie-Färbung der Fraktionen der Proteinreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 (Abb. 4.7 B) verdeutlicht bereits durch die stark ausgeprägte Bande in Höhe des rekombinanten Proteins von 36 kDa in allen Fraktionen der Aufreinigung die unvollständige Bindung des Zielproteins an die Streptactin Affinitätsmatrix. Dies wurde bestätigt durch die Immunodetektion des Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 durch das  $\alpha$ Strep Antiserum in allen Fraktionen der Aufreinigung (Abb. 4.7 C). Die Intensität des detektierten Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 Signals in der Durchflussfraktion war ebenso stark wie in der Eluatfraktion. Trotzdem konnte eine Anreicherung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 im Eluat gegenüber der Lysatfraktion beobachtet werden, da der Anteil *E. coli* eigener Proteine im Eluat verglichen zum Lysat geringer war, erkennbar an der Coomassie-Färbung der Fraktionen der Proteinreinigung. Um die Effizienz der Bindung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 an die Affinitätsmatrix zu optimieren und somit die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Aufreinigung in einem kleinen (*batch* Verfahren) Maßstab durchgeführt, wobei die Parameter der Expression beibehalten wurden (Tab. 4.2). Es zeigte sich, dass unter denselben



**Abb. 4.8 Aufreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 aus *E. coli* M15 [pREP4] in einem kleinen (*batch*) Maßstab. A** SDS-Gel der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung. **B** Immunodetektion der Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 (36 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat.

Bedingungen auch im kleinen (*batch*) Maßstab keine Optimierung der Proteinreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 gelang (Daten nicht gezeigt). Daher wurden nachfolgend verschiedene Parameter, wie unterschiedliche Bindungszeiten des rekombinanten Proteins an die Affinitätsmatrix oder verschiedene Salzkonzentrationen im Bindungs- bzw. Elutionspuffer getestet. In Abb. 4.8 ist ein Optimierungsansatz dargestellt, in dem die Inkubationszeit des Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 mit der Streptactin-Matrix erhöht wurde. Auch hier bestätigen die Coomassie-Färbung (Abb. 4.8 A) wie auch die Immunodetektion mit  $\alpha$ CCT2 Antiserum (Abb. 4.8 B) der Fraktionen der Proteinreinigung von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 die geringe Affinität des rekombinanten Proteins zur Affinitätsmatrix Streptactin. Der Großteil des Zielproteins befand sich immer noch im Durchfluss bzw. in der Waschfraktion, erkennbar an der stark ausgeprägten Bande in allen Fraktionen der Proteinreinigung in erwarteter Laufhöhe des rekombinanten Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 bei 36 kDa, vergleichbar zur Proteinreinigung mittels ÄKTA-Purifier (Abb. 4.7 C).

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 wurde die Eluatfraktion der Proteinreinigung des kleinen (*batch*) Maßstabes zunächst ankonzentriert und anschließend mittels Gelausschlussschromatographie aufgetrennt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass das rekombinante Protein in ankonzentrierter löslicher Form vermutlich als Oligomer vorliegt. Das Elutionsvolumen von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 (erwartete Größe 36 kDa) lag bei 8,15 ml, was einem Molekulargewicht von 1047 kDa bei Verwendung der Säule Superdex 200 10/300 GL entsprach (siehe auch Anhang A3). Die vorliegende oligomere Form von Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete geringe Affinität des Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 zur Streptactin Matrix, da die Oligomere vermutlich die Bindung des Proteins an die Matrix beeinflussen.

#### 4.1.3 Expression und Aufreinigung von His-Cry2 aus Sf21 Insektenzellen

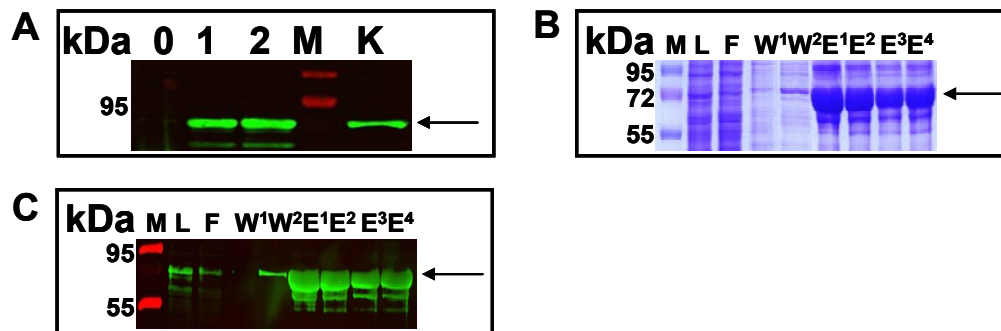
Das Konstrukt His-CRY2 kodiert für Volllängen (*full length*) Cryptochrom 2 mit einem N-terminalem His(6x)-Tag (Abb. 4.6). Die Expression des Konstruktes wurde in der Doktorarbeit von Roopa Banerjee (2007) in Sf21 Insektenzellen optimiert und die Expressionsbedingungen für diese Arbeit übernommen und nachfolgend tabellarisch mit den Konzentrationen der jeweiligen Eluate zusammengefasst (Tab. 4.3).

Konstrukt	Proteinkonzentration nach Aufreinigung	Verwendetes Verfahren zur Aufreinigung über Ni <sup>2+</sup> -NTA	Expressionsbedingungen
C-Terminus [His-CRY2]	E1 0,72 E2 0,41 E3 0,67 E4 0,1 in je 500µl	Batch-Verfahren mittels Affinitätschromatographie über eine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix	Vektor pBacPAK9; Sf21 Insektenzellen; Kulturvolumen 30 ml in BacPAK Complete Medium + 2,5 ml His-cry2 Virus Lösung (10 <sup>6</sup> pfu); Expressionszeit 72 h; Temp. 27°C

Tabelle 4.3: Übersicht über die Aufreinigung von His-CRY2

Die Analyse der Expression von His-CRY2 in Insektenzellen mittels Immunodetektion mit αHis-Antiserum zeigte, abhängig von der Zugabe der Virus-Lösung, eine Anreicherung von His-CRY2 in erwarteter Laufgröße von 72 kDa in infizierten (Abb. 4.9 A, Spur 1 und 2) im Vergleich zu nicht infizierten (Abb. 4.9 A, Spur 0) Insektenzellen. Als Kontrolle diente zuvor aufgereinigtes His-CRY2 (Abb. 4.9 A, Spur K). Die Proteinreinigung von His-CRY2 aus Insektenzellen erfolgte im kleinen (*batch*) Maßstab (Abb. 4.9). Die Proteinreinigung zeigte eine deutliche Anreicherung des Zielproteins in den verschiedenen Eluatfraktionen (Abb. 4.9 B und C, Spuren E<sup>1</sup>-E<sup>4</sup>). Dies wurde sowohl in der Coomassie-Färbung (Abb. 4.9 B) sowie in der Immunodetektion mit αHis-Antiserum (Abb. 4.9 C) der Fraktionen der Proteinreinigung von His-CRY2 beobachtet. Ebenfalls ersichtlich war ein geringer Reinheitsgrad von His-CRY2 in allen vier Eluat, da zusätzlich zu dem angereicherten Protein noch andere

Insektenzellproteine vorhanden waren, erkennbar anhand der Coomassie-Färbung der Fraktionen der Proteinreinigung. (Abb. 4.9 B, Spuren E<sup>1</sup>-E<sup>4</sup>).



**Abb. 4.9 Expression und Aufreinigung von His-CRY2 aus Insekten Zellen Sf(21) im kleinen (batch) Maßstab. A** LI-COR Odyssey Immunodetektion der löslichen Proteinextrakte der Expression mit αHis-Antiserum. **B** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung. **C** Immunodetektion der Fraktionen der chromatographischen Proteinreinigung mit αHis-Antiserum. Pfeil: erwartete Laufgröße des rekombinanten Proteins His-CRY2 (72 kDa); M: Molekulargewichtsmarker *Page Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot); L: Lysat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E1-4: Eluat; K: Kontrolle (aufgereinigtes His-CRY2); 0: löslicher Sf21 Zellextrakt ohne Virus Lösung; 1 und 2: löslicher sf21 Zellextrakt mit Virus Lösung.

#### 4.1.4 Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von rekombinantem His-CRY2 mit verschiedenen radioaktiv markierten möglichen Interaktionspartnern

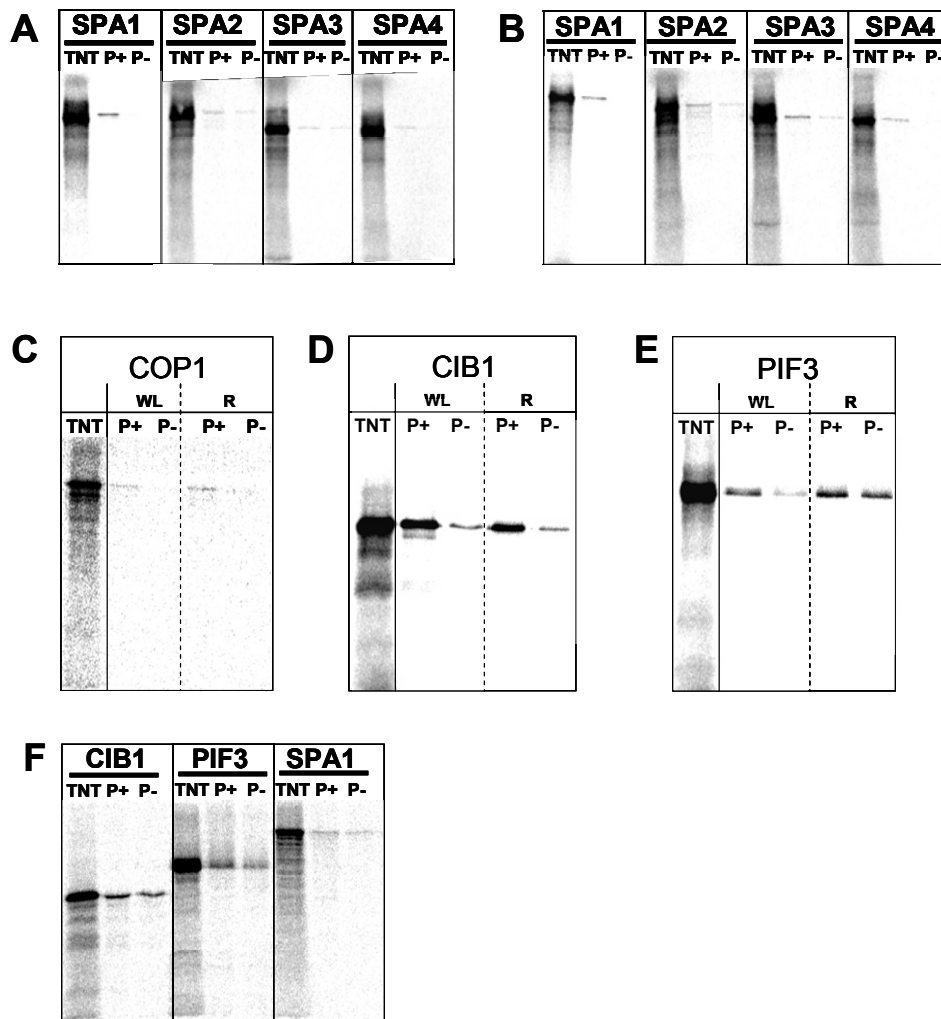
Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungen von rekombinanten COP1 Proteinen (4.1.1) und Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 (4.1.2) aus *E. coli* und nachfolgenden Co-Immunopräzipitationsstudien (Co-IP) konnte eine Interaktion zwischen beiden Proteinen *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mögliche Gründe hierfür waren neben dem unzureichenden Reinheitsgrad beider rekombinanter Proteine nach ihrer Aufreinigung vermutlich auch die Aggregation des Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2, welche eine Interaktion während der Co-IP *in vitro* verhindert haben könnte.

Um die Problematik der Proteinreinigung von rekombinanten COP1 Konstrukten zu umgehen, wurde nachfolgend die Methode der *in vitro* Transkription und Translation (TnT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega, Mannheim) für die Expression von COP1 genutzt. Das dadurch radioaktiv markierte COP1 konnte anschließend für eine *in vitro* Co-Immunopräzipitation mit aufgereinigtem His-CRY2 aus Insektenzellen (4.1.3) verwendet werden. Zusätzlich zu COP1 wurden noch verschiedene SPA Proteine (*Suppressor of Phytochrome A-105*, SPA1; *SPA1-related 2*, SPA2; *SPA1-related 3*, SPA3; *SPA1-related 4*, SPA4) im Zusammenhang mit der Untersuchung einer möglichen *in vivo* Funktion dieser Proteine auf die Stabilität von CRY2 (siehe Ergebnisteil 4.2) im TnT<sup>®</sup>-System exprimiert und anschließend wie auch COP1 als *prey*-Proteine in Co-IPs auf eine *in vitro* Interaktion mit rekombinantem His-CRY2 als *bait*-Protein hin untersucht. Als Positivkontrolle für die Interaktion mit rekombinantem His-CRY2 diente CIB1 (*Cryptochrome interacting basic-helix-*



*loop-helix 1*) (Liu *et al.*, 2008) und als weiteres Protein PIF3 (*Phytochrome interacting factor 3*), von dem bislang nur bekannt war, dass es mit Phytochrom interagiert (siehe Einleitung). Als Kontrolle der Spezifität der Interaktion mit His-CRY2 wurden SPA1, CIB1 und PIF3 zusätzlich mit His-EcPHR (*E. coli* Photolyase) (Diplomarbeit Christian Orth, 2008) als *bait*-Protein in einer Co-IP eingesetzt, um auszuschließen, dass der His-Tag eine unspezifische Interaktion vermittelt.

Alle Partner- bzw. *prey*-Proteine für die Co-IPs mit His-CRY2 wurden mit Hilfe des TnT-Kits synthetisiert und durch das bei der Translation verwendete <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert



**Abb. 4.10** *In vitro* Co-Immunopräzipitation von rekombinantem His-CRY2 und His-EcPHR als *bait*-Proteine mit unterschiedlichen <sup>35</sup>S-Methionin-gelabelten *prey*-Proteinen.

**A** und **B** Co-IP von rekombinantem His-CRY2 mit verschiedenen *in vitro* transkribierten/translatierten <sup>35</sup>S-Met-gelabelten SPA Proteinen. Die Inkubation erfolgte mit oder ohne His-CRY2 im Weiß- (A) bzw. Rotlicht (B). Die Co-IP erfolgte mit αHis-Antiserum und Dynabeads® Protein G (Invitrogen). **C-E** Gleicher Ansatz wie **A** und **B** mit *in vitro* transkribierten/translatierten <sup>35</sup>S-Met-gelabeltem COP1, CIB1 und PIF3. **F** Kontrollansätze mit His-EcPHR als *bait*-Protein im Weißlicht. Die jeweiligen Pelletfraktionen der Co-IPs wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch mit Hilfe des Phosphorimagers (*Storm BSO* Phosphorimaging System; *Molecular Dynamics*) visualisiert; P+: (Co-IP mit *bait*); P-: (Co-IP ohne *bait*); TNT: Aliquot der jeweiligen TNT-Reaktion (10 µl); WL: Weißlicht; R: Sicherheits-Rotlicht.



(Material Methoden, 3.2.3.2.4). Im Anschluss an die Co-IP wurde die jeweilige Pelletfraktion der Co-IP Reaktionen neben einem Aliquot der entsprechenden TNT-Reaktion auf einem SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Abbildung 4.10 zeigt die Autoradiographie der Ergebnisse für die Co-IPs von His-CRY2 (*bait*) mit den verschiedenen *prey*-Proteinen SPA1-SPA4, COP1, CIB1 und PIF3, sowie die Co-IP Kontrolle mit rekombinanter His-*EcPHR* (*bait*). Es wurden je *prey*-Protein zwei Co-IPs, eine im Weißlicht und eine im Sicherheits-Rotlicht, durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitationen von His-CRY2 mit verschiedenen *prey*-Proteinen im Weißlicht nicht wesentlich unterscheiden zu den Ergebnissen, die im Rotlicht generiert wurden. Die Co-IP der Positivkontrolle CIB1 mit His-CRY2 bestätigte die *in vitro* Interaktion der beiden Proteine, da bei Anwesenheit von His-CRY2 (P+) CIB1 in den Pelletfraktionen beider Reaktionen (Weißlicht bzw. Sicherheits-Rotlicht) detektiert werden konnte (Abb. 4.10 D). Die Menge an durch His-CRY2 präzipitiertem CIB1 Protein, gemessen anhand der Intensität der autoradiographisch visualisiert Proteinbanden, war im Weißlichtansatz geringfügig höher als im Rotlichtansatz. In beiden Reaktionen konnte nicht die Gesamtmenge an dem für die Co-IP eingesetztem CIB1 in den jeweiligen Pelletfraktionen detektiert werden, erkennbar an der stärkeren Bandenintensität von CIB1 des eingesetzten Aliquot des TNT-Ansatzes (TNT) im Vergleich zur Intensität der CIB1-Bande der Co-IP-Reaktion (P+) (Abb. 4.10 D). CIB1 konnte auch in den Pelletfraktionen der Co-IP Kontrollreaktionen ohne His-CRY2 (P-) sowohl im Weißlicht als auch im Sicherheits-Rotlicht detektiert werden, jedoch mit einer wesentlich geringeren Intensität als in der Co-IP mit His-CRY2 (P+).

Die Co-IP von PIF3 und His-CRY2 (Abb. 4.10 E) zeigte ein Signal von PIF3 in der Pelletfraktion (P+) des Weißlicht- und des Rotlicht-Ansatzes. Dies war so nicht ohne weiteres erwartet worden, weil PIF3 bislang als spezifischer Phytochrom-Interaktionspartner beschrieben worden war. Zusätzlich konnte ein Unterschied zwischen dem Weißlicht- und Rotlichtansatz in der Kontroll-Co-IP von PIF3 ohne His-CRY2 (Abb. 4.10 E, (P-)) beobachtet werden. Die Intensität des PIF3 Signals im Rotlichtansatz war höher (Abb. 4.10 E; R (P-)) als das PIF3-Signal des Weißlichtansatzes (Abb.4.10 E; WL (P-)). In allen Pelletfraktionen (P+, P-) der jeweiligen Co-IPs von PIF3 konnte nicht das gesamte PIF3 Protein präzipitiert werden, erkennbar an den geringeren Intensitäten der detektierten Signale von PIF3 verglichen mit den Intensitäten des jeweiligen TNT-Aliquots (Abb. 4.10 E).

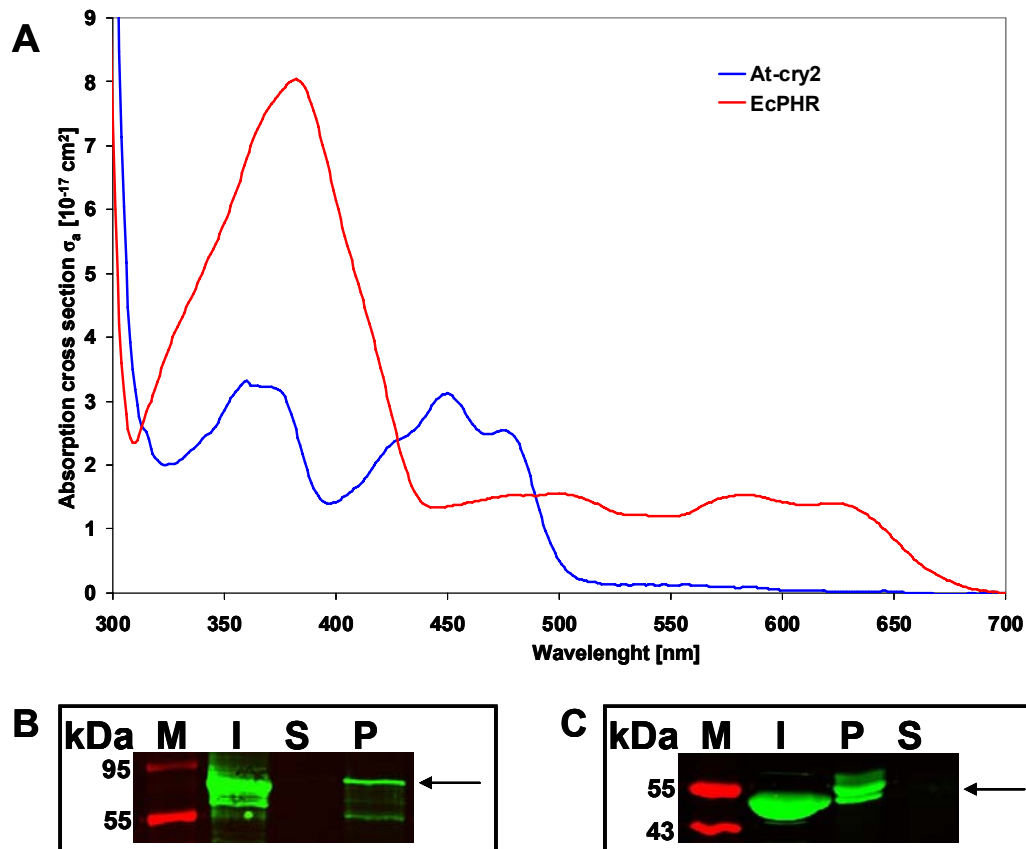
Die Ergebnisse der Co-IP der *prey*-Proteine SPA1 und SPA4 zeigten jeweils nur ein Signal in den Pelletfraktionen der Co-IPs mit dem eingesetzten *bait* His-CRY2 (P+) und kein Signal in den Kontrollansätzen ohne His-CRY2 (P-), unabhängig von den Lichtbedingungen (Abb. 4.10 A und B). Dies deutet auf eine von His-CRY2 abhängige Präzipitation von SPA1 bzw. SPA 4 und somit auf eine *in vitro* Interaktion dieser beiden Proteine mit His-CRY2 hin. Die

geringe Intensität der detektierten Signale von SPA1 und SPA4 im Vergleich zum dem für die Co-IP eingesetzten TNT–Aliquot spricht für eine geringe Affinität von His-CRY2 zu den beiden *prey*-Proteinen (Abb. 4.10 A und B).

Für die *prey*-Proteine SPA2 und SPA3 zeigte sich hingegen, unabhängig von den Lichtbedingungen, kein Unterschied in den Co-IPs (Abb. 4.10 A und B). Beide *prey*-Proteine konnten in den aufgetragenen Pelletfraktionen der Co-IPs mit (P+) bzw. ohne (P-) das *bait*-Protein His-CRY2 mit schwacher Signalstärke detektiert werden. Diese unspezifischen Reaktionen deuten daher nicht auf eine *in vitro* Interaktion von SPA2 und SPA3 mit His-CRY2 hin. Zwar sind die Intensitäten der Signale von SPA2 und SPA3 in beiden Co-IPs vergleichbar mit der detektierten Signalstärke von SPA1 und SPA4 in der Co-IP mit His-CRY2 (P+), aber die Detektion von SPA2 und SPA3 in beiden Pellet-Fractionen (P+ und P-) war somit unabhängig von der Anwesenheit des *bait*-Proteins. Dies lässt auf eine unspezifische Reaktion der beiden Proteine mit  $\alpha$ His-Antiserum oder mit der eingesetzten *Magneto-beads* gekoppelten G-Agarose schließen.

Die Co-IP von COP1 mit His-CRY2 zeigte unabhängig von der Lichtqualität ein Signal wenn His-CRY2 vorhanden war (P+), im Gegensatz zu den Kontrollansätzen die kein His-CRY2 (P-) enthielten (Abb. 4.10 C). Daher kann von einer spezifischen, His-CRY2-abhängigen Präzipitation von COP1 gesprochen werden, was für eine Interaktion beider Proteine *in vitro* spricht. Eine geringe Affinität von COP1 zu His-CRY2 zeigte sich in der geringen Signalstärke des COP1 Signals in der Pelletfraktion der Co-IP (P+) im Vergleich zu dem TNT-Ansatz (TNT).

Die in verschiedenen Co-IPs beobachtete Detektion der jeweiligen *prey*-Protein Signale auch in den Kontrollansätzen ohne Zugabe von His-CRY2 (P-) lag vermutlich an einer unspezifischen Interaktion der *prey*-Proteine mit dem für die Co-IP verwendeten  $\alpha$ His-Antiserum bzw. den Dynabeads®. Diese Annahme wurde durch die Kontrollansätze der Co-IPs mit der His-*EcPHR* als *bait*-Protein bestätigt. Diese zeigten für die drei getesteten *prey*-Proteine CIB1, PIF3 und SPA1, dass unabhängig von Zugabe von His-*EcPHR* ein Signal detektiert werden konnte (Abb. 4.10 F; P+, P-). Die Detektion der *prey*-Proteine in beiden Pelletfraktionen (P+ und P-) entspricht somit einer unspezifischen Präzipitation dieser Proteine und entspricht dem erwarteten Ergebnis, dass His-*EcPHR* mit keinem der getesteten Proteine *in vitro* interagiert.



**Abb. 4.11 Untersuchung der in den *in vitro* Co-Immunopräzipitationen eingesetzten *bait*-Proteine His-CRY2 und His-EcPHR.** **A** UV-VIS Absorptionsspektren der *bait*-Proteine His-CRY2 (blau) und His-EcPHR (rot). **B** und **C** Immunodetektion mit  $\alpha$ His-Antiserum der Immunopräzipitation von His-CRY2 (**C**) und His-EcPHR (**D**) mit  $\alpha$ His-Antiserum und Dynabeads® Protein G (Invitrogen). M: Molekulargewichtsmarker Page Ruler (Fermentas); I: His-CRY2 bzw. His-EcPHR (10  $\mu$ l); S: Überstand; P: Pelletfraktion; Pfeil: erwartete Laufgröße von His-CRY2 (72 kDa) bzw. von His-EcPHR (55 kDa).

Die eingesetzten *bait*-Proteine His-CRY2 und His-EcPHR wurden zuvor auf die Anwesenheit ihrer Kofaktoren, FAD für His-CRY2 bzw. 5,10-MethenylTHF und FAD für His-EcPHR, und die daraus resultierende Fähigkeit, einen Photozyklus zu durchlaufen mittels UV-VIS Spektroskopie überprüft (Abb. 4.11 A). Das Absorptionsspektrum des rekombinanten Proteins His-CRY2 zeigte die Anwesenheit von gebundenem oxidiertem FAD, zu erkennen an der Feinstruktur von FAD<sub>ox</sub> mit maximaler Absorption bei 450 nm und Schultern bei 420 und 475 nm. Das Absorptionsmaximum bei 380 nm von His-EcPHR sprach für die Anwesenheit von proteingebundenen 5,10-MethenylTHF, die Absorption im Bereich von 450 nm für die Anwesenheit von oxidiertem FAD (Christian Orth, Diplomarbeit 2008).

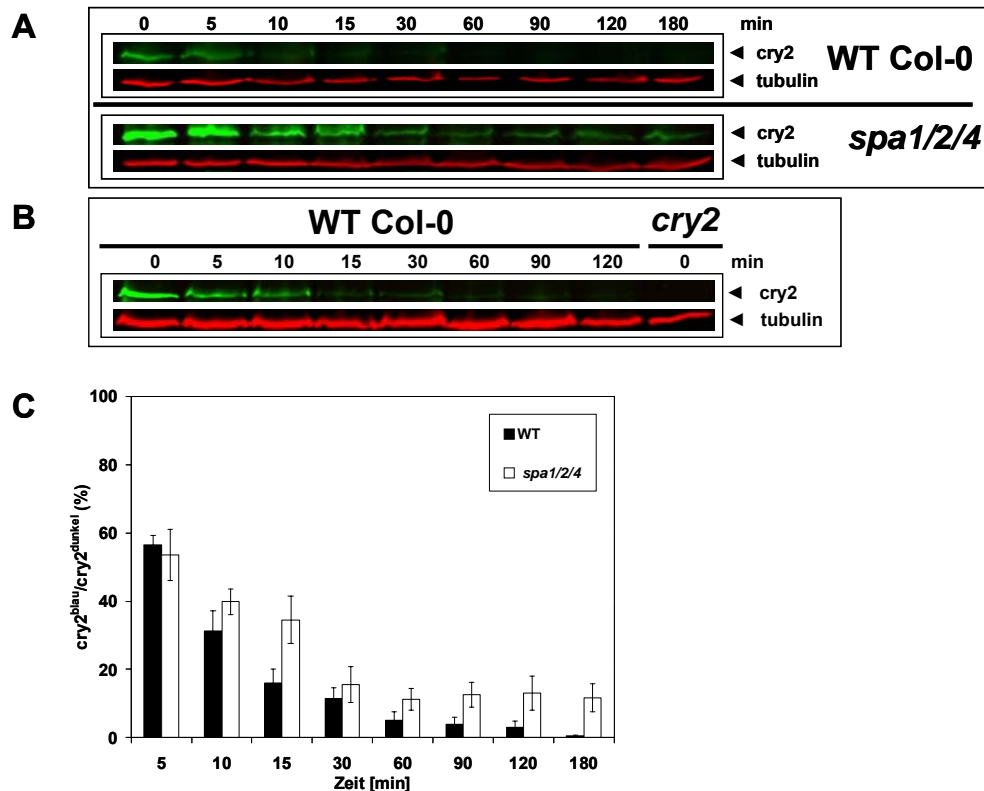
Um die Spezifität der eingesetzten rekombinanten *bait*-Proteine His-CRY2 und His-EcPHR zum in den Co-IPs eingesetzten  $\alpha$ His-Antiserum zu überprüfen, wurden Immunopräzipitationen (IP) durchgeführt (Abb. 4.11 B und C). Nach Inkubation der jeweiligen *bait*-Proteine mit  $\alpha$ His-Antiserum und Dynabeads® Protein G wurden die jeweiligen Überstandsfraktionen (S) und die Pelletfraktionen (P) neben einem 10  $\mu$ l Aliquot (I) der eingesetzten Proteinprobe über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-

Transfer über eine Immunodetektion mit  $\alpha$ His-Antiserum nachgewiesen. Wie in Abb. 4.11 B und C zu erkennen ist, wurden die beiden rekombinanten Proteine jeweils nur in den Pelletfraktionen der IP nachgewiesen. Die Signalintensitäten in den Pelletfraktionen entsprachen zwar nicht den Intensitäten der Mengen an dem für die IP eingesetztem jeweiligem *bait*-Protein (Vergleich P mit I), aber aufgrund fehlender Detektion in den Überstandfraktionen (S), konnte die jeweilige Spezifität beider Proteine zum  $\alpha$ His-Antiserum nachgewiesen werden.

## 4.2 Blaulichabhängige Degradation von CRY2 in *Arabidopsis thaliana*

### 4.2.1 Einfluss von SPA Proteinen auf die Kinetik des CRY2 Abbaus

Alle vier SPA-Proteine, SPA1, SPA2, SPA3 und SPA4, interagieren mit COP1 *in vitro* über ihre *coiled-coil* Domänen (Hoecker und Quail, 2001; Laubinger und Hoecker, 2003; Laubinger *et al.*, 2004; Hoecker, 2005) und regulieren zusammen wichtige Komponenten der Signaltransduktion im Licht. Ferner wurde für SPA1 (*Suppressor of Phytochrom A-105*) eine Interaktion mit COP1 *in vivo* nachgewiesen (Saijo *et al.*, 2003). Die Mitglieder der SPA-Proteinfamilie besitzen eine ähnliche Domänenstruktur wie COP1 (siehe Einleitung Kapitel 1.5.2) und haben Einfluss auf die Repression der Photomorphogenese im Dunkeln (Laubinger *et al.*, 2004). Weiterhin haben die SPA Proteine Einfluss auf verschiedene Licht-regulierte Signalantworten in Abhängigkeit von Phytochrom A (Hoecker *et al.*, 1999; Laubinger und Hoecker, 2003; Laubinger *et al.*, 2004; Fittinghoff *et al.*, 2006). Aufgrund der Rolle von COP1 bei der blaulichabhängigen Degradation von CRY2 (Shalitin *et al.*, 2002) und des gemeinsamen Wirkens der SPA-Proteine mit COP1 (Übersicht in Hoecker, 2005), sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Einfluss der SPA-Proteine auf die Stabilität bzw. die blaulichabhängige Degradation von CRY2 untersucht werden. Dazu wurden zwei Wochen alte auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten im Dunkeln angezogene *Arabidopsis thaliana* Keimlinge des *Columbia* (Col-0) Wildtyps und der *spa 1/2/4* Dreifachmutante im gleichen Ökotyp, für drei Stunden mit einer konstanten Fluenzrate ( $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bei 471 nm belichtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach Isolation der Proteingesamtextrakte aus den Proben wurden je 20  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Extrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Western-Transfer durch eine Immunodetektion mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum und dem LI-COR Odyssey System analysiert. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt und mit Hilfe der LI-COR Odyssey Software ausgewertet (Material und Methoden 3.2.3.13). Nachfolgend dargestellt ist die quantitative Auswertung der Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, sowie exemplarisch ein immunologischer Nachweis der Proteinmenge von CRY2 mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum in den jeweiligen Proteinextrakten über die Zeit.



**Abb. 4.12 Blaublichtabhängige Degradation von CRY2 über die Zeit in Arabidopsis WT Col-0 und *spa 1/2/4* Mutanten Keimlingen.** **A** Immunologischer Nachweis der Degradation von CRY2-Protein im WT und in der *spa 1/2/4*-Mutante mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum sowie Tubulin als Ladekontrolle mittels  $\alpha$ Tubulin-Antiserum. **B** Immunologischer Nachweis der Degradation von CRY2 Protein im WT Col-0 im Vergleich zur *cry2* Mutante als Kontrolle der Spezifität des eingesetzten  $\alpha$ CCT2-Antiserums. **C** Quantitative Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten der blaublichtabhängigen Degradation von CRY2 Protein im WT Col-0 (schwarz) und in der *spa 1/2/4* Mutante (weiß) über die Zeit.

In Abbildung 4.12 A ist die Kinetik der Abnahme der Menge an CRY2 Protein unter Blaublicht über die Zeit in WT Col-0 und *spa 1/2/4* Mutanten-Keimlingen dargestellt. Als Ladekontrolle wurde parallel zur Inkubation mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum auch  $\alpha$ Tubulin-Antiserum eingesetzt. Konsistent mit Befunden aus der Literatur (Ahmad *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2007) begann im Col-0 WT die Degradation von CRY2 kurz nach Beginn der Bestrahlung mit Blaublicht (Abb. 4.12 A, WT: 5 min im Vergleich zu 0 min) und nach einem Zeitraum von 10 min ist das CRY2-Signal bereits nur noch schwach detektierbar. In der *spa 1/2/4* Dreifachmutante hingegen war der Prozess der Degradation von CRY2 verlangsamt, was durch die geringere Abnahme der Signalstärke des CRY2 Proteins über die Zeit deutlich wird (Abb. 4.12 A, *spa 1/2/4*). Im Vergleich zum Col-0 WT war in der *spa 1/2/4*-Mutante auch nach 180 min immer noch ein schwaches CRY2 Signal zu detektieren. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wurde durch die Verwendung einer *cry2*-Mutante (Abb. 4.12 B) überprüft, die keinem Blaublicht ausgesetzt worden war. Ein quantitativer Vergleich der blaublichtabhängigen Abnahme der CRY2 Proteinmenge über die Zeit ist in dem Diagramm in Abb. 4.12 C als Mittelwerte mit dazugehörigen Standardfehler aus drei unabhängigen

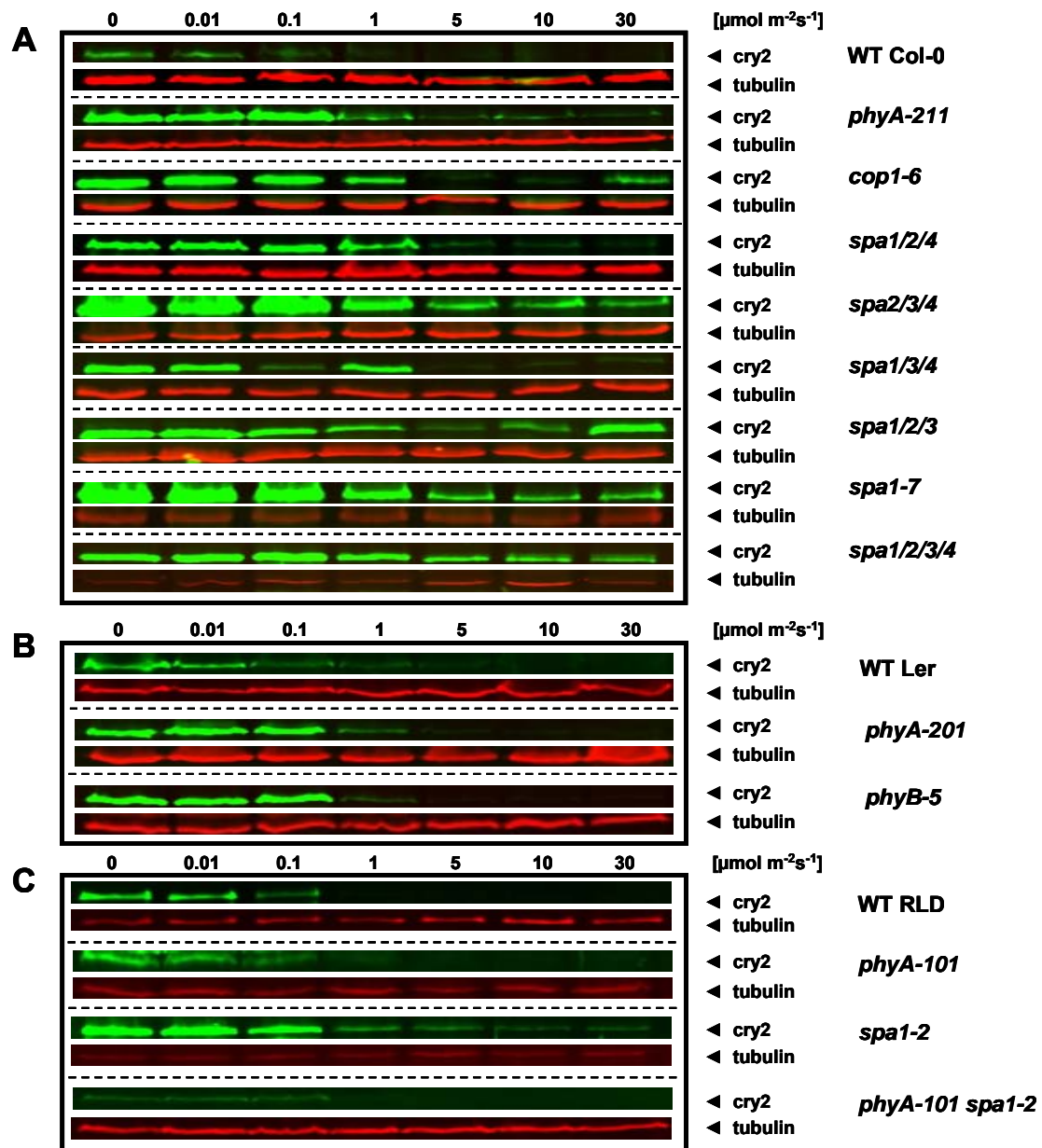
Experimenten dargestellt. Hierfür wurde die CRY2-Signalintensität jedes Messpunktes quantifiziert, auf das Tubulin Signal normiert und ins Verhältnis zur normierten Signalintensität des jeweiligen Zeitpunktes 0 min (dem CRY2 Proteinlevel im Dunkel, 100%) gesetzt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.3.13). Wie in Abb. 4.12 A ist der verlangsamte Abbau von CRY2 unter Blaulicht in der *spa 1/2/4* Dreifach-Mutante im Vergleich zum WT zu erkennen. Zum Zeitpunkt 15 min waren im WT ~20% in der *spa 1/2/4* Dreifachmutante noch ~40% der ursprünglichen CRY2 Proteinmenge vorhanden. Nach 180 min Blaubelichtung wurde im WT nahezu kein CRY2 Protein (ca. 1%) in der *spa 1/2/4* Mutante hingegen noch ~10% detektiert.

Die verlangsamte Abnahme des CRY2 Proteins in der *spa 1/2/4* Mutante verglichen mit dem entsprechenden Wildtyps nach Beginn der Blaulichtbestrahlung lässt somit auf einen Einfluss dieser SPA-Proteine auf den Abbau von CRY2 schließen.

#### 4.2.2 Fluenzratenabhängiger Abbau von CRY2 im Blaulicht

Um den beobachteten Einfluss von SPA-Proteinen (Ergebnisteil 4.2.1) auf die Stabilität von CRY2 näher zu untersuchen, und den Einfluss der vier SPA-Proteine im Einzelnen aufzuklären, wurden mehrere *spa*-Mutanten (Einzel-, Dreifach- und Vierfach-Mutanten) mit den entsprechenden Wildtypen verglichen. Des Weiteren wurden neben Phytochrom A und B Photorezeptor-Mutanten (*phyA-201/-211/-101* und *phyB-5*) auch eine *phy/spa* Doppelmutante (*phyA-101/spa1-2*) sowie eine *cop*-Einzelmutante (*cop1-6*) auf ihr Verhalten bei der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 hin untersucht. Um einen möglichen Einfluss der ausgeschalteten Gene bzw. der von ihnen kodierten Proteine auf die blaulichtabhängige Degradation von CRY2 festzustellen, erfolgte die Analyse des CRY2 Proteinlevels nach Blaubelichtung mit verschiedenen Fluenzraten. Hierfür wurden 4 Tage alte, im Dunkeln angezogene *Arabidopsis* Keimlinge für 2 h verschiedenen Fluenzraten ( $0-30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von Licht einer Wellenlänge von 471 nm ausgesetzt. Als Kontrolle dienten wiederum nicht bestrahlte Keimlinge (Material und Methoden, Kapitel 3.2.1.3.3). Die CRY2 Gehalte wurden in den Pflanzenextrakten über Immunodetektion mit  $\alpha\text{CRY2}$ -Antiserum bestimmt.

Western-Blots, die die blaulichtabhängige Abnahme des CRY2 Proteins abhängig von den Fluenzraten in den verschiedenen Genotypen zeigen, sind in Abb. 4.13 dargestellt. Es zeigten sich klare Unterschiede in der fluenzratenabhängigen Degradation von CRY2 beim Vergleich der untersuchten Ökotypen bzw. Genotypen. Die Intensität des CRY2 Signals entsprechend der CRY2 Proteinmenge war im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich ( $0.1$  und  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in den untersuchten Mutanten höher als in ihren entsprechenden Wildtypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) (Abb. 4.13).

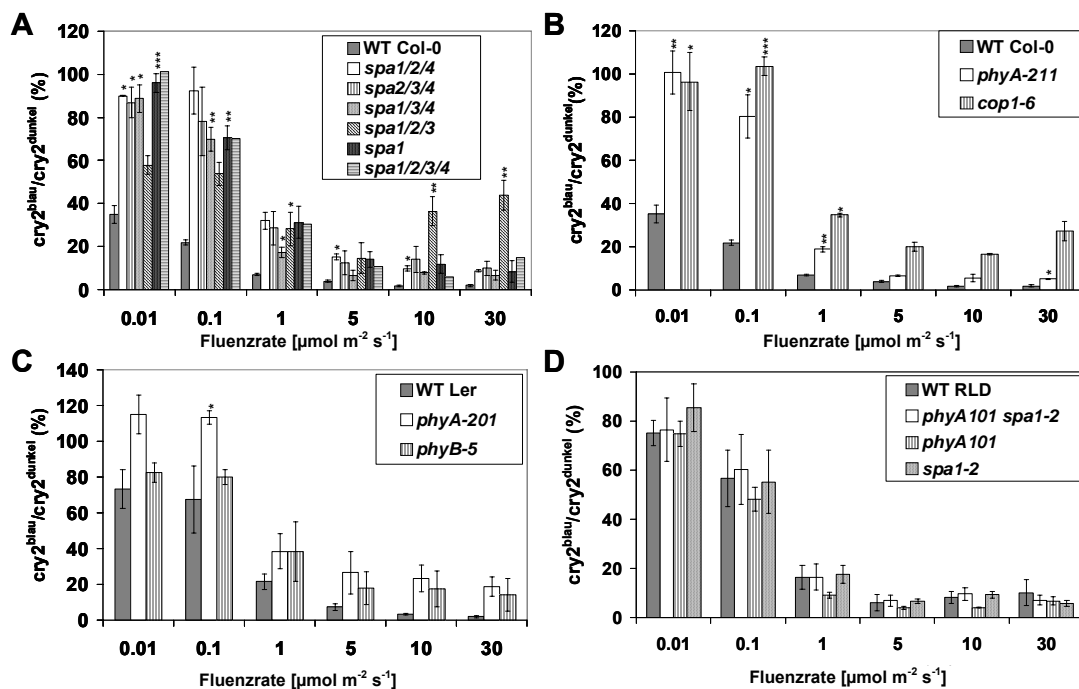


**Abb. 4.13 Immunologischer Nachweis des Abbaus von CRY2 abhängig von der Fluenzrate.** CRY2 wurde mit αCCT2 Antiserum (grün) nachgewiesen, die Detektion von Tubulin mit αTubulin-Antiserum (rot) erfolgte zur jeweiligen internen Ladekontrolle. Die Keimlinge wurden mit verschiedenen Fluenzraten von Blaulicht (471 nm, 0- 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) über einen konstanten Belichtungszeitraum von 2 h Stunden. **A** *Columbia* (Col-0) Wildtyp und verschiedenen Genotypen im gleichen WT-Hintergrund. **B** *Landsberg erecta* (Ler) Wildtyp und entsprechenden Genotypen im gleichen WT-Hintergrund. **C** *Reschew* (RLD) und entsprechenden Genotypen im gleichen WT-Hintergrund. Konstante Belichtungszeit von zwei Stunden.

Ausnahmen bildeten hierbei nur die drei Mutanten *spa 1/3/4*, *phyA-101* und die Mutante *phyA-101/spa 1-2*, die in diesem Fluenzratenbereich ähnliche CRY2 Mengen wie ihr Wildtyp aufwiesen. Des Weiteren konnte im niedrigen Fluenzratenbereich (0.1 und 0.01 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) eine höhere CRY2 Proteinmenge in den beiden Phytochrom A Mutanten *phyA-211* und *phyA-201* im Vergleich zu ihren entsprechenden Wildtypen beobachtet werden (Abb. 4.13 A und B). Im hohen Fluenzratenbereich (30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) lässt sich bei der CRY2 Proteinmenge

ein deutlicher Unterschied bei den Mutanten *cop1-6*, *spa 2/3/4*, *spa 1/2/3*, *spa 1-7*, *spa 1/2/3/4* (Abb. 4.13 A) und *spa1-2* (Abb. 4.13 C) zu ihrem entsprechenden Wildtyp erkennen. Die Mutanten *spa 1/3/4*, *phyA-101* und die Mutante *phyA-101/spa 1-2*, wiesen im niedrigen sowie im hohen Fluenzratenbereich im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen keinen Unterschied im CRY2 Abbau auf.

Um den in Abb. 4.13 qualitativ zu beobachteten Einfluss von SPA-Proteinen und von Phytochrom A auf den blaulichtabhängigen Abbau von CRY2 genauer zu analysieren, erfolgte eine quantitative Auswertung dieser Blots. Die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind in Abb. 4.14 gezeigt. Die quantitative Analyse erfolgte, nach Normierung der Signalstärken auf die interne Ladekontrolle von Tubulin durch Vergleich der Signalstärken des CRY2 Proteins der belichteten Proben mit ihrer entsprechenden Dunkelkontrolle, wobei diese auf 100% festgesetzt wurde (Material und Methoden, Kapitel 3.2.3.13).



**Abb. 4.14** Quantitative Auswertung der fluenzratenabhängigen CRY2 Degradation in verschiedenen Ökotypen und Genotypen von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen über einen konstanten Belichtungszeitraum (471 nm) von 2 h.

**A** Vergleich aller getesteten *spa*-Mutanten mit dem entsprechenden Wildtyp *Columbia* (Col-0). **B** Vergleich der Mutanten *phyA 211* und *cop1-6* im *Columbia* (Col-0) Hintergrund. **C** *phyA-201* und *phyB-5* im *Landsberg erecta* (Ler) Hintergrund. **D** *phyA-101/spa1-2*, *phyA-101* und *spa1-2* im *Reschew* (RLD) Hintergrund. Die relative Abnahme der CRY2 Proteinmenge wurde bezogen auf die entsprechende Dunkelkontrolle bezogen. Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Sternchen: ermittelte Signifikanz der Messwerte mittels t-Test (p-Wert  $\leq 0.05$  (\*),  $\leq 0.01$  (\*\*),  $\leq 0.001$  (\*\*\*)). Für die Quantifizierung wurde die Fluenzrate  $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  gleich 100% gesetzt.



Ein Vergleich der fluenzratenabhängigen Degradation von CRY2 im Col-0 WT mit verschiedenen *spa* Mutanten zeigte einen auffälligen Unterschied in der noch vorhandenen Menge an CRY2-Protein nach 2 h Bestrahlung im niedrigen Fluenzratenbereich (Abb. 4.14. A; 0.01 und 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Im Col-0 WT war die CRY2 Proteinmenge bei einer Fluenzrate von 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  unter 40% der unbestrahlten Kontrolle, bei einer Fluenzrate von 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bei ~20%. Hingegen unterschritt die Menge an CRY2 Protein in den verschiedenen *spa* Mutanten für beide Fluenzraten, 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , nicht 70% der Ausgangsmenge. Ausnahme bildete nur die *spa 1/2/3* Mutante, die eine geringfügig stärkere Degradation von ca. 60% bzw. 55% für die Fluenzraten 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  aufwies. Auch bei steigender Fluenzrate, im Bereich von 1 bis 5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , war der CRY2 Proteinlevel in den *spa* Mutanten höher, jedoch war der Unterschied nicht so signifikant, wie in dem vorher beschrieben niedrigen Fluenzratenbereich (ca. 10%). Die *spa 1/2/3* Mutante, die keinen so starken Effekt wie alle übrigen *spa*-Mutanten im niedrigen Fluenzratenbereich aufwies, zeigte einen signifikanten Unterschied im hohen Fluenzratenbereich. So war die Menge an CRY2-Protein in der *spa 1/2/3* Mutante (40%) ca. 10fach höher als die Menge an detektiertem CRY2 Protein im WT (4%).

Ein Einfluss der SPA-Proteine insgesamt auf die blaulichtabhängige Degradation von CRY2 (Ergebnis 4.2.1) sowie die Abhängigkeit von der eingesetzten Fluenzrate konnte somit bestätigt werden. Zusätzlich zeigte dieses Experiment ebenfalls einen bis dahin unbekannten blaulichtabhängigen Einfluss von Phytochrom A (Abb. 4.13 A und B) auf die Stabilität von CRY2, in Abhängigkeit von der Fluenzrate.

Analyse der Vierfachmutante *spa 1/2/3/4* zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp, wobei hier auch nur das Ergebnis einer Messung dargestellt ist.

Der Vergleich zwei weiterer Mutanten, nämlich *cop1-6* und *phyA 211* ist in Abb.4.14 B dargestellt. Der bekannte Einfluss (Shalitin *et al.*, 2002) von COP1 auf die Stabilität von CRY2 wurde hier ebenfalls beobachtet, da die *cop1-6* Mutante eine stark verringerte Degradation von CRY2 über den gesamten getesteten Fluenzratenbereich im Vergleich zum WT zeigte. Der größte Unterschied wurde auch hier im niedrigen (*very low*) Fluenzratenbereich detektiert. Für die Fluenzraten von 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  lag der ermittelte Wert für die Menge an CRY2-Protein in der *cop1-6*-Mutante mit ca. 100% deutlich höher als im WT (40% bzw. 20%). Im hohen Fluenzratenbereich (30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) war der CRY2 Proteinlevel mit ca. 30% in der *cop1-6* Mutante immer noch deutlich höher als WT.

Der Unterschied im Abbau von CRY2 im niedrigen Fluenzratenbereich zeigte sich auch in der untersuchten *phyA-211*-Mutante. Bei der Blaulichtbelichtung mit einer Fluenzrate von 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  lag der CRY2 Proteinlevel bei ~100% und bei einer Fluenzrate von 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bei ~80% der Ausgangsmenge. Im hohen Fluenzratenbereich (5-30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) war

die Degradation von CRY2 ähnlich zum WT (Abb.4.14 B). Somit konnte der bereits qualitativ anhand der Immunodetektion beobachtete blaulichlichtabhängige Phytochrom A Effekt auf den Abbau von CRY2 (Abb.4.13 A und B) auch in der quantitativen Analyse bestätigt werden.

Aufgrund der Beobachtung, dass der Photorezeptor Phytochrom B ebenfalls Einfluss auf unterschiedliche Blaulicht-regulierte Prozesse, wie Inhibition des Hypokotyllängenwachstums, Expansion der Kotolydonen sowie die Akkumulation von Anthocyanen (Casal und Boccalandro, 1995; Neff und Van Volkenburgh, 1994; Poppe *et al.*, 1996) hat, wurde eine *phyB-5* Mutante im Hinblick auf die Stabilität von CRY2 untersucht. Zusätzlich wurde die Degradation von CRY2 in einer *phyA-201* Mutante im gleichem Ler (*Landsberg erecta*) Hintergrund wie die *phyB-5* Mutante untersucht (Abb. 4.13 B). Im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich ( $0.01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) war die Menge an detektiertem CRY2-Protein in der *phyA-201* Mutante mit ~115% höher als im Ler WT (~80%) (Abb. 4.14 C). Der Unterschied war aber geringer als im Experiment im *Columbia* Hintergrund (Abb. 4.14 B). Zusätzlich zeigte die Darstellung einen Anstieg der CRY2 Proteinmenge in der *phyA-201*-Mutante in den Fluenzratenbereichen von  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit ~115% und  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit ~110% des Ausgangsproteinlevels (Abb.4.14 C).

Bei der Abwesenheit von einem funktionstüchtigem Photorezeptor Phytochrom B konnte kein Effekt auf die Stabilität bzw. auf die Degradation von CRY2 unter Blaulicht beobachtet werden, unabhängig von den verwendeten Fluenzraten. Die untersuchte *phyB-5* Mutante zeigte einen ähnlichen Abbau von CRY2 Protein wie der WT.

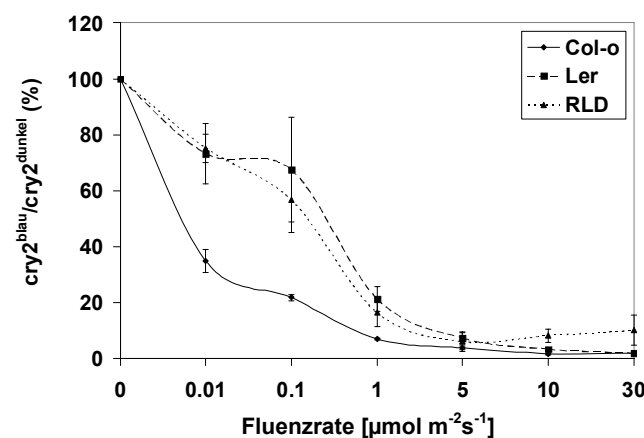
Der im Vergleich zum entsprechenden WT beobachtete Unterschied in der CRY2 Degradationsrate im niedrigen (*low*) Fluenzratenbereich der beiden *phyA* Mutanten (*phyA-211* und *phyA-201*) nahm bei steigender Fluenzrate ab (Abb.4.14 B und C). Die beiden Mutanten zeigten im hohen Fluenzratenbereich eine dem entsprechenden Wildtyp ähnlichen Abbau von CRY2, so dass von einem blaulichlichtabhängigen Einfluss von Phytochrom A auf die Degradation von CRY2 nur im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich ausgegangen werden muss.

Ausgehend von der Überlegung, ob der beobachtete Einfluss von Phytochrom A und den SPA-Proteine auf die Stabilität von CRY2 additiv wirken könnte, wurden neben einer *phyA-101*-Mutante und einer *spa1-2* Mutante auch eine *phyA-101/spa1-2* Doppelmutante im *Reschew* (RLD) Hintergrund untersucht (Abb. 4.14 D). Der vorher beobachtete Effekt eines langsameren CRY2 Abbaus in Abwesenheit der Proteine Phytochrom A, bzw. SPA1 (Abb. 4.14 A-C) im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich wurde bei allen drei untersuchten Mutanten nicht beobachtet werden. Die Mutanten *phyA-101* und *spa1-2* Mutanten zeigten im Fluenzratenbereich  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mit ~75% bzw. ~85% des Ausgangsproteinlevel eine stärkere CRY2 Proteindegradation im RLD-Hintergrund als im Col-0-, bzw. Ler-Hintergrund.

Ein möglicher kumulativer Effekt in der *phyA-101/spa1-2* Mutante konnte nicht beobachtet werden. Die Doppelmutante zeigte ähnlich wie die entsprechenden Einzelmutanten keinen signifikanten Unterschied im Abbau von CRY2 unter allen getesteten Fluenzraten im Vergleich zum WT (Abb. 4.14 D).

Die vor allem im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich beobachteten Unterschiede in der Degradationsrate von CRY2 in den drei untersuchten Ökotypen Col-0, Ler und RLD wurde zur genaueren Analyse in Abb.4.15 dargestellt. Ein Vergleich der CRY2 Degradation der Wildtypen RLD und Ler zeigte im niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich einen langsameren CRY2 Abbau im Vergleich zu dem Col-0 WT. Die Menge an detektiertem CRY2 Protein war bei einer Fluenzrate von  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  im RLD und Ler WT (ca. 80%) höher als im Col-0 WT (ca. 40%).

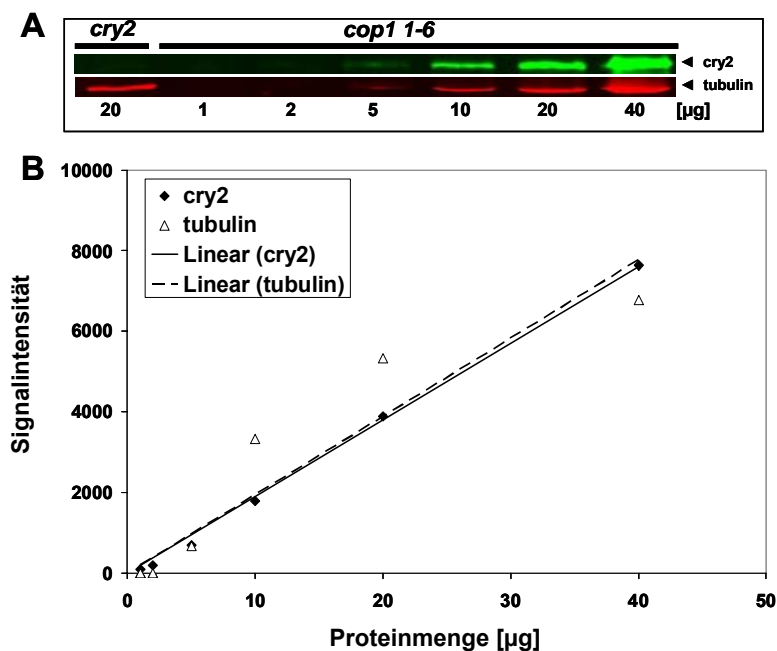
Die unterschiedlichen Degradationsraten von CRY2 im Col-0 verglichen mit dem Ler, bzw. RLD Wildtyp näherten sich mit zunehmender Intensität der Fluenzraten an. Ab einer Fluenzrate von  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  zeigte sich nahezu kein Unterschied im CRY2 Proteinlevel aller drei untersuchten Ökotypen.



**Abb. 4.15** Quantitative Auswertung der fluenzratenabhängigen Abbau von CRY2 in den untersuchten Ökotypen Col-0, Ler und RLD über einen konstanten Belichtungszeitraum (471 nm) von 2 h. Die prozentuale Abnahme der CRY2 Proteinmenge wurde bezogen auf 100% der entsprechenden Dunkelkontrolle ( $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Auswertung der Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Längsbalken geben den Standardfehler an.

### 4.2.3 Bestimmung des Zusammenhangs von Signalstärke und Proteinmenge bei Verwendung des LI-COR Odyssey Systems

Um zu überprüfen, ob die gemessenen Intensitäten der detektierten Signale von CRY2 und Tubulin, im immunologischen Nachweis mit der eingesetzten Proteinmenge korrelierte, wurde eine Eichgerade erstellt. Dazu wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen eines isolierten Gesamtproteinextraktes der Dunkelkontrolle einer *cop1-6*-Mutante über ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Kontrolle der Spezifität des  $\alpha$ CCT2 Antiserums erfolgte durch zusätzliche Analyse eines Aliquots des Gesamtproteinextraktes der Dunkelkontrolle einer *cry2* Mutante. Nach Western-Transfer und Detektion der Proteine mittels immunologischem Nachweis mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum bzw.  $\alpha$ Tubulin-Antiserum erfolgte die Auswertung mit Hilfe der LI-COR Odyssey Software. Die Immunodetektion zeigte bei steigender Proteinmenge die Zunahme der Intensität der detektierten Signale von CRY2 (Abb.4.16 A; grün) bzw. Tubulin (Abb.4.16 A, rot). Die Analyse des Proteinextraktes der *cry2* Mutante zeigte wie erwartet kein Signal für das CRY2-Protein und bestätigte somit die Spezifität des  $\alpha$ CCT2-Antiserums.

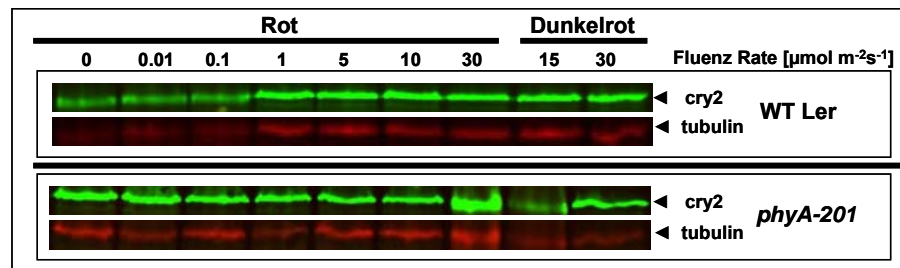


**Abb. 4.16 Eichgerade der gemessenen Signalintensitäten bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge. A** Immunologischer Nachweis von CRY2 mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum (grün) und Tubulin mit  $\alpha$ Tubulin Antiserum (rot) aus einem Proteingesamtextrakt der *cop1-6*-Mutante von 2 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen nach 2 h Inkubation im Dunkeln. **B** Auftragung der Proteinmenge (x-Achse) gegen die detektierte Signalintensitäten (y-Achse).

Die Auftragung der Proteinmenge (x-Achse) gegen die entsprechende gemessenen Signalintensitäten (y-Achse) ist in Abb. 4.16 B dargestellt. Die Funktion zeigte, dass die Signalintensität linear zu der Zunahme der Proteinmenge stieg. Dies unterstützt die Aussagekraft der Quantifizierung der vorher gezeigten Daten (Ergebnisse 4.1 und 4.2) und verdeutlicht, dass die Menge an eingesetztem CRY2 Protein im Zusammenhang mit der gemessenen Signalintensität stand.

#### 4.2.4 Einfluss von Rot- und Dunkelrotbestrahlung auf die Stabilität von CRY2

Um zu prüfen, ob der beobachtete Unterschied in der CRY2-Degradation zwischen WT (Col-0 und Ler) und den *phyA-211*- und *phyA-201*-Mutanten blaulicht spezifisch war (Ergebnisse 4.2), wurde ein gleicher Versuchsansatz im Rot bzw. Dunkelrot durchgeführt. Die Abb.4.17 zeigt den immunologischen Nachweis mit  $\alpha$ CCT2-Antiserum von CRY2 im Ler WT und der *phyA-201*-Mutante unter verschiedene Fluenzraten im Rotlicht (660 nm; 0-30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und zwei Fluenzraten im Dunkelrotlicht (740 nm; 15 und 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Konsistent mit bekannten Daten aus der Literatur (Ahmad et al., 1998; Lin et al., 1998; Yu et al., 2007) hatten die untersuchten Rot- bzw. Dunkelrotlicht Verhältnisse keinen Einfluss auf die Stabilität von CRY2. Sowohl im Ler WT wie auch in der *phyA-201* Mutante erfolgte keine Degradation von CRY2-Protein unter Rot- bzw. Dunkelrotlichtbedingungen, unabhängig von den getesteten Fluenzraten. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der beobachtete Einfluss von Phytochrom A auf die Stabilität von CRY2 bzw. dessen verlangsamte Degradation in den *phyA-211* und *phyA-201* Mutanten blaulichtabhängig war. Die schwächeren Signalintensitäten von CRY2 im Ler WT im niedrigen Fluenzratenbereich (0 - 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) verglichen mit dem hohen Fluenzratenbereich (1 – 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sind durch mögliche Pipettierfehlern oder Fehler in der Berechnung der Proteinkonzentration zu erklären, da die schwächere Signalintensität genauso für das Tubulinsignal in diesem Fluenzratenbereich gilt.

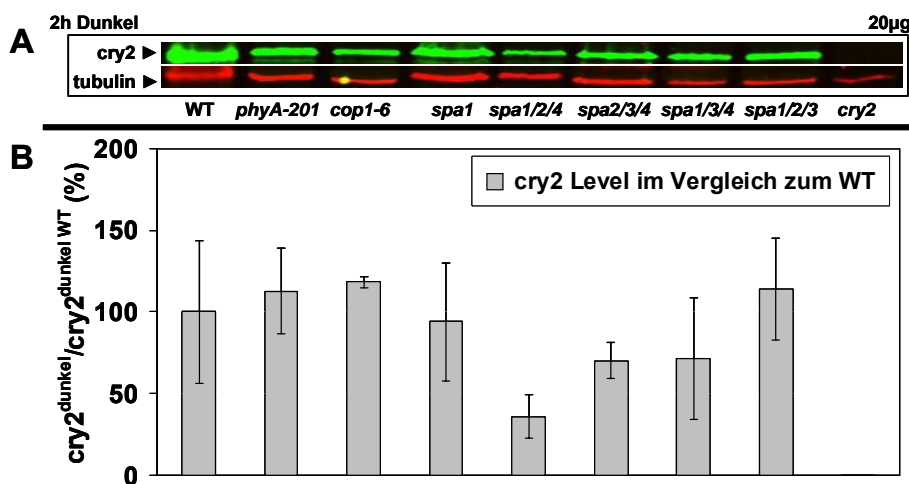


**Abb. 4.17 Vergleich des immunologischen Nachweise von CRY2 Protein nach Bestrahlung mit Rot- (660 nm) bzw. Dunkelrotlicht (740 nm) mit verschiedenen Fluenzraten für 2 h im Ler WT und der *phyA-201* Mutante von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen.** Immunologischer Nachweis von CRY2 mit  $\alpha$ CCT2 Antiserum (grün) und Tubulin mit  $\alpha$ Tubulin Antiserum (rot). Tubulin diente als interne Ladekontrolle.

#### 4.2.5 Vergleich des CRY2-Proteinlevels in verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*

Zur Untersuchung der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 erfolgte zusätzlich eine Analyse des Ausgangslevels an CRY2 Protein in den einzelnen untersuchten Ökotypen bzw. Genotypen. Dazu wurde der CRY2 Proteingehalt in den Gesamtproteinextrakten aus nicht belichteten 2 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen verschiedener Genotypen im *Columbia* Hintergrund über Immunodetektion mit  $\alpha$ CCT2 Antiserum analysiert. Die Analyse und Quantifizierung des Ausgangslevels an CRY2 Protein erfolgte in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ein immunologischer Nachweis ist exemplarisch in Abb.4.18 A dargestellt. In der Kontrolle durch Analyse der *cry2*-Mutante konnte wie erwartet kein Signal von CRY2 detektiert werden. Im qualitativen visuellen Vergleich der Intensitäten des CRY2 Signals im WT Col-0 erscheint der Proteinlevel höher zu sein als in den verschiedenen Mutanten Genotypen (Abb. 4.18). Jedoch ergab die Quantifizierung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten einen im Vergleich zum Col-0 WT höheren Ausgangslevel an CRY2 Protein in den Mutanten *phyA-201* und *cop1-6* (Abb.4.18 B). Dieser Unterschied zwischen dem exemplarisch dargestellten immunologischen Nachweis im Vergleich zur Quantifizierung der CRY2 Proteinlevel im WT Col-0 resultierte aus der Tatsache, dass das jeweilige CRY2 Signal auf das entsprechende Tubulinsignal normiert wurde.

Die Analyse der *spa* Mutanten erbrachte unterschiedliche Ausgangslevel an CRY2 Protein in den einzelnen Mutanten verglichen mit dem entsprechenden WT Col-0. Die Menge an CRY2



**Abb. 4.18 Vergleich der CRY2-Menge in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen im Col-0 WT und verschiedenen Mutanten im Dunkeln. A** Immunologischer Nachweis von CRY2 mit  $\alpha$ CCT2 Antiserum (grün) und Tubulin mit  $\alpha$ Tubulin Antiserum (rot). Tubulin diente als interne Ladekontrolle. **B** Quantitative Darstellung der Analyse des CRY2 Proteinlevels im WT Col-0 und verschiedenen Mutanten im Col-0 Hintergrund.. Längsbalken geben den Standardfehler an. Für die Quantifizierung wurde die Menge an CRY2 des WT Col-0 gleich 100% gesetzt.

in der *spa 1/2/4*-Mutante verglichen mit dem Col-0 WT beträgt mit ~45 % weniger als die Hälfte. Die Mutanten *spa 2/3/4* und *spa 1/3/4* wiesen mit ~70 % ebenfalls einen geringeren CRY2 Proteingehalt auf bezogen auf die CRY2 Proteinmenge im Col-0 WT. Im Gegensatz dazu zeigten die *spa 1/2/3* sowie die *spa1* Mutante einen nahezu gleich hohen CRY2 Proteingehalt wie der Col-0 WT. Ein direkter Einfluss der SPA Proteine auf die Stabilität von CRY2 im dunkeln lässt sich aus diesem Versuch nicht ableiten, da die Standardfehler einzelner Werte, wie z.B. die von der *spa1-7-* oder der *spa 1/3/4*-Mutante zu groß waren und somit einen Vergleich der CRY2 Ausgangsproteinlevel im Dunkel-Status der einzelnen Mutanten erschwert.

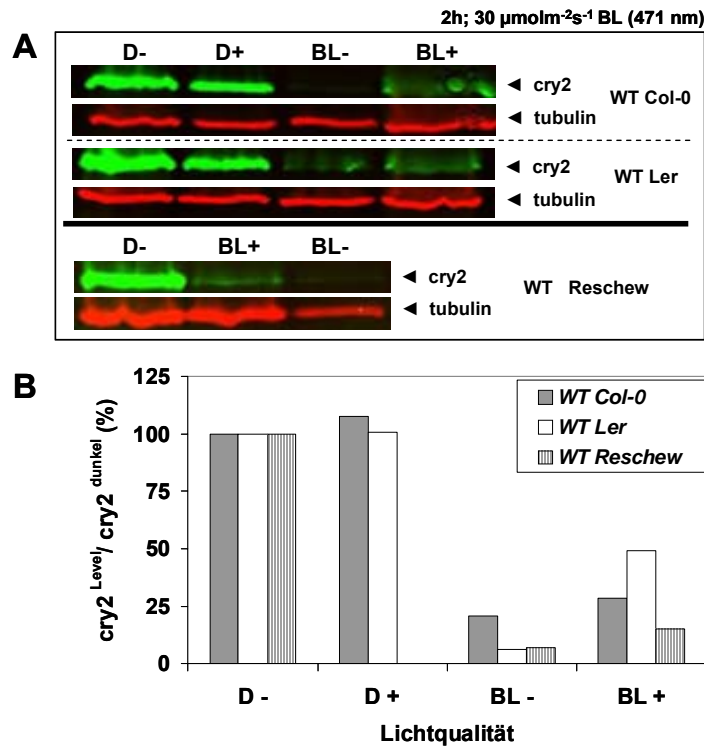
#### 4.2.6 Einfluss von Proteasom-Inhibitoren auf den Abbau von CRY2 im Blaulicht

Um die bereits aus der Literatur (Yu *et al.*, 2007, 2009) bekannte proteasomale Degradation von CRY2 nach Blaulichtbelichtung in den unterschiedlichen verwendeten Ökotypen zu vergleichen, wurde der in Abb. 4.19 dargestellte Ansatz gewählt.

Der Nachweis einer blaulichtabhängigen, proteasomalen Proteindegradation von CRY2 erfolgte durch Analyse der Proteinmengen von CRY2 aus Keimlingen, die vor der Blaubelichtung (2 h, 471 nm; 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) mit Proteasom Inhibitoren bzw. zur Kontrolle ohne Inhibitoren behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrolle dienten entsprechende Ansätze die Dunkel inkubiert wurden. Der quantitative Vergleich der CRY2 Proteinmenge in den Gesamtproteinextrakten erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western-Transfer durch immunologischen Nachweis mittels  $\alpha\text{CCT2}$  Antiserum.

Wie erwartet zeigte der in Abb.4.19 A dargestellte immunologische Nachweis von CRY2 nur unter Blaulicht und ohne Proteasom Inhibitoren eine Degradation des Proteins. In den untersuchten Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) konnte unter diesen Bedingungen (BL-) kein bzw. nur ein schwaches CRY2 Signal detektiert werden. Die Analyse der Ansätze die zuvor mit Proteasom Inhibitoren inkubiert wurden zeigte unter gleichen Belichtungsbedingungen (BL+) immer noch die Anwesenheit des CRY2 Proteins. In den im Dunkeln gehaltenen Kontrollansätzen (D- und D+) konnte ebenso wie erwartet CRY2 detektiert werden. Das Fehlen der Kontrolle D+ für den Ökotyp RLD lag an fehlendem Pflanzenmaterial aufgrund einer geringen Keimungsrate der Samen.

Abb.4.19 B zeigt die quantitative Auswertung der Signalintensitäten von CRY2 der Ansätze aus Abb. 4.19 A. Der Vergleich der einzelnen Ökotypen ist bezogen auf die jeweilige Kontrolle im Dunkeln ohne Proteasom Inhibitoren (D-). Der dunkel gehaltene Kontrollansatz nach Inkubation der Keimlinge mit Proteasom Inhibitoren (D+) zeigte im Wesentlichen keinen



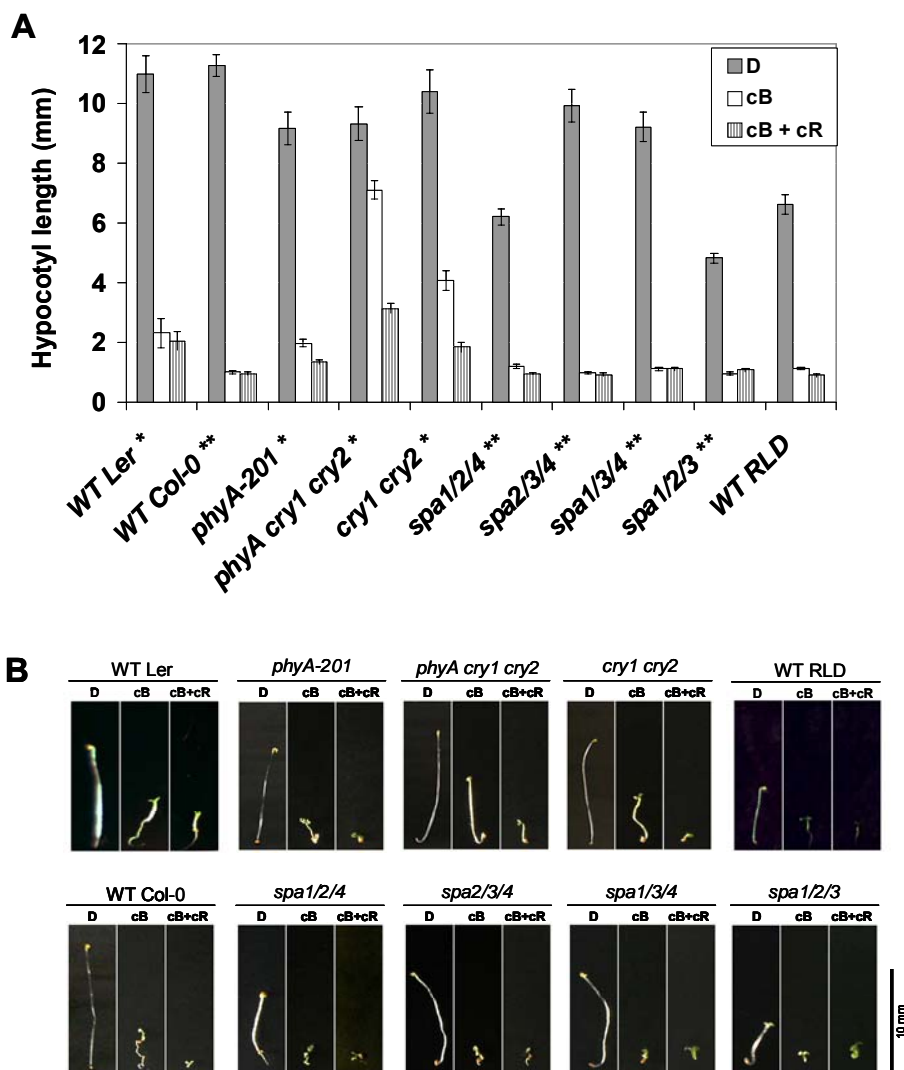
**Abb. 4.19 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Degradation von CRY2 bei drei verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen unter Blaulicht.** **A** Immunologischer Nachweis von CRY2 im Dunkeln (D) oder im Blaulicht (BL). Mit (+) oder ohne (-) Proteasom-Inhibitor-Mix (ALLN; MG132; MG115; PS1 alle Merck, Germany; in DMSO). **B** quantitative Darstellung der gemessenen Signalintensitäten bezogen auf den Wert im Dunkeln ohne Proteasom-Inhibitor-Mix (D- =100%).

großen Unterschied in der Menge an detektiertem CRY2-Protein zwischen den Ökotypen Col-0 und Ler; die Daten für RLD fehlen (siehe oben). Der gleiche Ansatz mit Proteasom Inhibitoren zeigte nach einer Blaubelichtung (BL+) keine vollständige Inhibition der Degradation von CRY2. Die verbliebene Menge an CRY2 in diesen Ansätzen (BL+) lag in den Ökotypen Col-0 mit 30% und Ler mit 50% geringfügig höher als im RLD Ökotyp mit 20% des CRY2 Ausgangsproteinlevel im Vergleich zu der Dunkelkontrolle ohne Proteasom Inhibitoren (Abb.4.19 B, Vergleich BL+ zu D-). Dennoch zeigte sich im Vergleich dieser Ansätze mit Proteasom Inhibitoren (BL+) zu Proben ohne Proteasom Inhibitoren (BL-) nach Blaubelichtung immer noch eine Inhibition der proteasomalen Degradation von CRY2. Die CRY2 Proteinlevel mit ~10% für Ler und RLD und ~20% für Col-0 der Ansätze ohne vorige Inkubation mit Proteasom Inhibitoren lagen niedriger als die entsprechenden CRY2 Proteinlevel der Ansätze mit Proteasom Inhibitoren. Da der hier dargestellte Vergleich aber die Ergebnisse einer Analyse zeigen, sind weitere Wiederholungen der Ansätze von Nöten um diese Aussage zu stützen.



#### 4.2.7 Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums bei verschiedenen Lichtqualitäten

Die in Abb.4.20 B dargestellten Phänotypen der unterschiedlichen getesteten Genotypen zeigten deutlich die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen unter Blaulicht. Der Vergleich mit den entsprechenden Keimlingen die im Dauer Dunkel wuchsen zeigte bei allen Genotypen längere Hypokotyle als die der Keimlinge die unter Dauer Blaulicht gewachsen waren. Dennoch war ein Unterschied im Ausmaß der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums zwischen den einzelnen Genotypen sichtbar. Die Mutante *phyA/cry1/cry2* und die Mutante *cry1/cry2* zeigten aufgrund



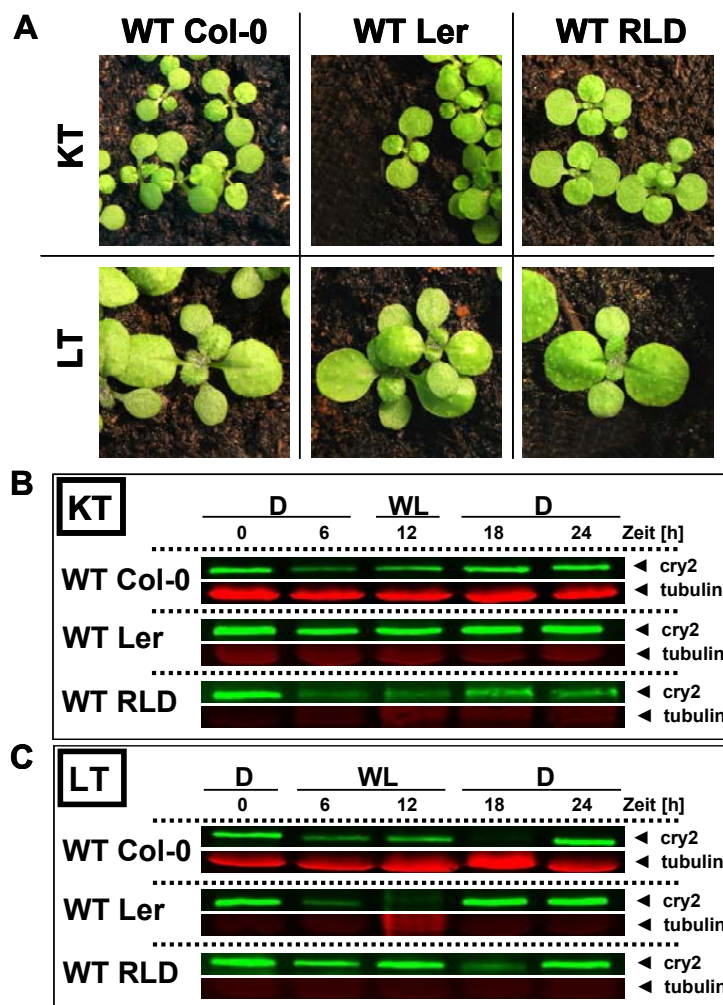
**Abb. 4.20 Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen verschiedener Genotypen unter Blaulicht bzw. Blaulicht/Rotlicht . A** Quantifizierung der Hypokotyllängen von Keimlingen verschiedener Genotypen, die zuvor verschiedenen Lichtqualitäten Dauer Dunkel (cD), Dauer Blaulicht (cB,  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) oder Dauer Blau- und Rotlicht (cB + cR, beide  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) für 96 h ausgesetzt wurden. Sternchen markieren den entsprechenden Ökotyp-Hintergrund der Genotypen: \* Ler, \*\* Col-0. **B** Darstellung der Phänotypen von 96 h alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen verschiedener Genotypen von der Hypokotyllängenmessung aus (A).

der Abwesenheit der Cryptochrome keine so ausgeprägte Inhibierung des Wachstums unter konstantem Blaulicht. Dies bereits bekannten Daten aus der Literatur (Ahmad and Cashmore, 1993; Whitelam *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1998; Shinomura *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2002). Die Kombination aus Blaulicht und Rotlicht führte bei allen Genotypen zu einem Phänotyp mit verstärkter Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums im Vergleich zum Phänotyp unter alleiniger Blaulichtbestrahlung. Die *phyA/cry1/cry2* Mutante zeigte unter konstanter Blau-Rotlicht Bestrahlung ein im Vergleich zum Ler WT längeres Hypokotyl, d.h. das auch die Abwesenheit des Phytochrom A sich auf die Inhibition des Hypokotyllängenwachstums auswirkt, wie bereits zuvor von Lariguet and Fankhauser (2004) gezeigt. Alle untersuchten *spa* Mutanten zeigten unter konstantem Blaulicht, bzw. Blau- und Rotlicht einen ähnlichen Phänotyp, d.h. ein gleiches Ausmaß der Inhibierung wie ihr entsprechender Col-0 Wildtyp. Ein Unterschied in den Hypokotyllängen zeigte sich nur im Dauer Dunkel. Die *spa 1/2/4* und die *spa 1/2/3* zeigten unter diesen Bedingungen ein im Vergleich zum Col-0 WT verkürztes Hypokotyl. Dies bestätigt auch die quantitative Auswertung der Hypokotyllängenmessung von 20 Keimlingen. (n= 20; Abb. 4.20 A). Die durchschnittliche ( $\emptyset$ ) Hypokotyllänge der Mutanten *spa 1/2/4* mit 6 mm und *spa 1/2/3* mit 5 mm war im Vergleich zum Col-0 WT mit 11 mm unter Dauer Dunkel verkürzt. Unter konstantem Blaulicht, bzw. Blau- und Rotlicht zeigten alle vier getesteten *spa* Mutanten die gleiche Inhibierung wie der Col-0 WT mit einer Hypokotyllänge von  $\emptyset$  1 mm. Die Mutanten *phyA/cry1/cry2* und *cry1/cry2* zeigten ausgehend von einer Hypokotyllänge von  $\emptyset$  10 mm im Dauer Dunkel einen Inhibition auf eine  $\emptyset$  Hypokotyllänge von 7 mm bzw. von  $\emptyset$  4 mm unter Dauer Blaulicht und somit die geringste Inhibierung im Vergleich zu Ler WT mit  $\emptyset$  2 mm. Ein Analyse der drei getesteten Ökotypen Col-0, Ler und RLD zeigte ein geringeres Hypokotyllängenwachstum im Ökotyp RLD mit einer  $\emptyset$  Hypokotyllänge von 7 mm im Dunkeln verglichen mit  $\emptyset$  11 mm der beiden anderen Ökotypen Ler und Col-0.

#### 4.2.8 CRY2 Proteinmenge unter Lang- und Kurztag-Bedingungen

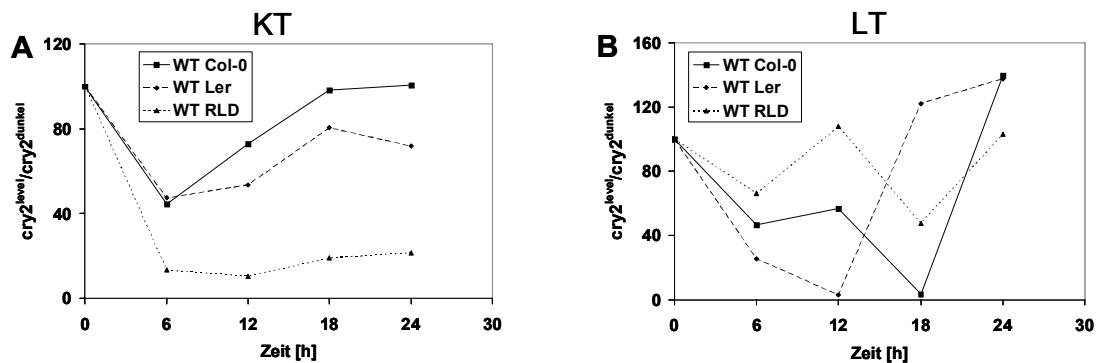
Die untersuchten Ökotypen Col-0, Ler und RLD zeigten wie bereits oben beschrieben Unterschiede in der in der blaulichtabhängigen Degradationsrate von CRY2 Protein. Zur genaueren Analyse dieses Aspektes wurde daher der Proteinlevel von CRY2 in zwei Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen der verschiedenen Ökotypen miteinander verglichen. Die Pflanzen wurden entweder im Lang- oder im Kurztag angezogen und über einen Zeitraum von 24 h im Hinblick auf ihre CRY2 Proteinmenge hin analysiert. Alle drei Ökotypen zeigten wie erwartet im Kurztag (KT) eine langsamere Entwicklung als im Langtag (LT), erkennbar anhand der geringeren Anzahl der Rosettenblätter, wie auch qualitativ betrachtet die geringere Größe der Blattflächen (Abb. 4.21 A).

Über einen Zeitraum von 24 h wurden alle 6 h Proben der einzelnen Ökotypen genommen und der daraus isolierte Gesamtproteinextrakt mittels Immunodetektion  $\alpha$ CCT2 Antiserum auf ihren CRY2 Proteingehalt hin untersucht (Abb. 4.21 B). Der qualitative Vergleich zeigte, dass die Intensitäten des detektierten CRY2 Signals der drei verschiedenen Ökotypen in den unter Kurztag-Bedingungen entnommen Proben Unterschiede je nach Ökotyp, bzw. auch nach dem Zeitpunkt der Probenentnahme aufwies. Während der Proteinlevel von CRY2 im Ler Ökotyp über den gesamten Zeitraum relativ konstant blieb, variierte die Proteinmenge von CRY2 sowohl im Col-0 wie auch im RLD Ökotyp in den einzelnen Weißlicht (WL) und Dunkel (D) Phasen.



**Abb. 4.21 Vergleich der CRY2-Proteinlevel in den Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) im Lang- und Kurztag.** **A** Phänotypen zwei Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen der Ökotypen Col-0, Ler und RLD im Kurztag (KT) und im Langtag (LT). **B** Immunologischer Nachweis von CRY2 mit  $\alpha$ CCT2 Antiserum (grün) und Tubulin mit  $\alpha$ Tubulin Antiserum (rot) aus Proteinextrakten von Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Kurztag entnommen worden sind. Tubulin diente als interne Ladekontrolle. **C** Gleicher immunologischer Nachweis wie in (B) nur wurden die Proben im Langtag entnommen. D: Dunkelphase; WL: Weißlichtphase

Im Col-0 Ökotyp nahm die Intensität des detektierten CRY2 Signals nach 6 h zunächst im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ab, stieg aber nach 12 h wieder an und erreichte zum Zeitpunkt 18 h wieder das Ausgangsniveau vom Zeitpunkt 0 h. Für den Ökotyp RLD konnte festgestellt werden, dass die Signalintensität des detektierten CRY2 nach 6 h deutlich abschwächte verglichen zum Zeitpunkt 0 h, anschließend sich leicht erhöhte (Zeitpunkt 12 h) und auf einem konstanten Niveau blieb ohne jedoch die Ausgangssignalstärke vom Zeitpunkt 0 h zu erreichen. Unter Langtag-Bedingungen wurde die Signalintensität des detektierten CRY2 im Col-0 Ökotyp vom Zeitpunkt 6 h an schwächer und war zum Zeitpunkt 18 h nicht mehr zu detektieren. Beim Zeitpunkt 24 h erreichte die Intensität des detektierten CRY2 wieder das gleiche Niveau wie zum Zeitpunkt 0 h. Unter Langtag-Bedingungen zeigte auch der Ler Ökotyp eine Varianz in CRY2 Proteinlevel über einen 24 h Zeitrahmen. Der Ler Ökotyp zeigte zunächst eine Abnahme der detektierten CRY2 Signalsintensität bis zum Zeitpunkt 12 h. Nach 18 h erreichte die Signalstärke von CRY2 bereits das Niveau wie zum Zeitpunkt 0 h und blieb auf diesem Level bis 24 h. Der immunologische Nachweis von CRY2 im Ökotyp RLD zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen Ökotypen im Langtag keine Abnahme der Intensität des CRY2 Signals vom Zeitpunkt 0 h ausgehend bis zum Zeitpunkt 12 h. Erst ab dem Zeitpunkt 18 h war eine deutlich Abnahme der Signalstärke zu beobachten und zum Zeitpunkt 24 h hatte die Signalintensität wieder das Niveau zum Zeitpunkt 0 h erreicht.



**Abb. 4.22 Kinetik der Änderung des CRY2 Proteinlevels über einen Zeitraum von 24 Stunden in zwei Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen der Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) angezogen unter Kurztag, bzw. Langtag-Bedingungen. A Vergleich der CRY2 Proteinmenge unter Kurztag (KT) der drei Ökotypen in Abhängigkeit vom Messpunkt 0 (0= 100%). B Vergleich der CRY2 Proteinmenge unter Langtag (LT) der drei Ökotypen in Abhängigkeit vom Messpunkt 0 (0= 100%).**

Die sich bereits anhand der Immunodetektion der CRY2 Proteinlevel in den drei Ökotypen (Abb. 4.21 B und C) visuell abzeichnenden Unterschiede wurden bezogen auf die jeweilige Intensität zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%) quantitativ aufgetragen und verglichen. Abbildung 4.22 A zeigt die Zu- bzw. Abnahme der CRY2 Signalintensität zu den jeweiligen Messzeitpunkten unter Kurztag-Bedingungen. Während die Menge an detektiertem CRY2 in den beiden Ökotypen Col-0 und Ler zum Zeitpunkt 6 h noch ca. 40% der

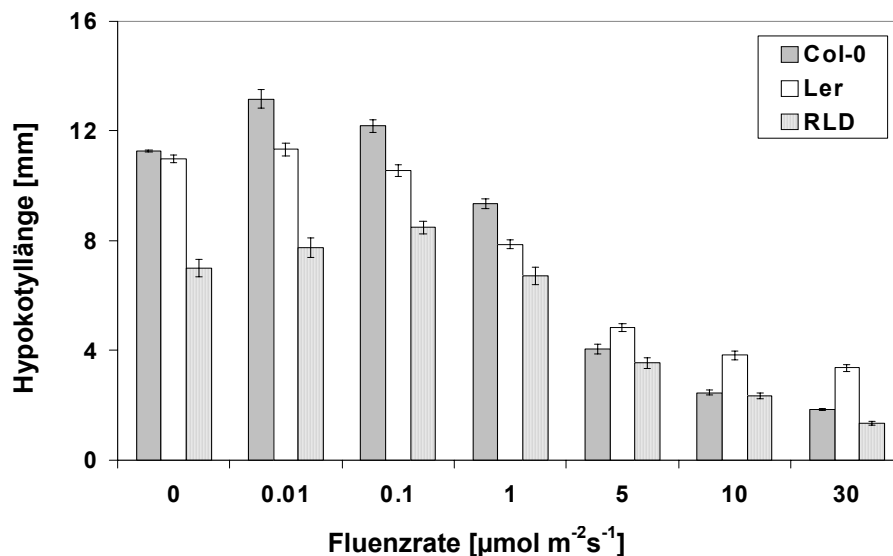
Ausgangsproteinmenge bezogen auf den Zeitpunkt 0 h betrug, zeigte der Ökotyp RLD zum gleichen Zeitpunkt bereits eine Abnahme auf unter 20%. Der Ökotyp Col-0 erreichte bis zum Zeitpunkt 18 h wieder das Niveau vom Zeitpunkt 0 h (100%) und blieb bis zum Zeitpunkt 24 Stunden konstant, während der Ler Ökotyp zum Zeitpunkt 18 h und 24 h nur 80% des CRY2 Ausgangslevels erreichte. Im Gegensatz dazu blieb die Menge an detektiertem CRY2 Protein im RLD Ökotyp für die Zeitpunkte 12 bis 24 h auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie zum Zeitpunkt 6 h und überschritt die Menge von ca. 20 % nicht.

Betrachtet man den Vergleich der Menge an CRY2 Protein unter Langtag so ergab sich für die einzelnen Ökotypen ein anderes Bild (Abb. 4.22 B). Während die Menge an detektiertem CRY2 Protein im Col-0 Ökotyp zum Zeitpunkt 18 h fast 0% der Ausgangsproteinmenge zum Zeitpunkt 0 h aufwies, konnte dies für den Ler Ökotyp bereits nach 12 h beobachtet werden. Nach 24 h betrug die Menge an detektiertem CRY2 bei beiden Ökotypen Col-0 und Ler ca. 130% des Ausgangsproteinlevels zum Zeitpunkt 0 h. Der Ökotyp RLD zeigte unter Langtag-Bedingungen eine Rhythmik innerhalb der im Abstand von 6 Stunden gelegenen Messzeitpunkte. Zu den Zeitpunkten 6 und 18 h lag die detektierte Menge an CRY2 bei ca. 60%, während die Menge an CRY2 zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 h ca. 100% betrug bezogen auf den Ausgangsproteinlevel zum Zeitpunkt 0 h.

#### **4.2.9 Blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums bei verschiedenen Fluenzraten**

In den untersuchten Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) lies sich eine unterschiedliche Degradationsrate von CRY2 Protein unter Blaulicht verschiedener Fluenzraten (Ergebnisse 4.2.2, Abb. 4.15) beobachten. Daher sollte des Weiteren getestet werden, ob und inwieweit sich dieser Unterschied an CRY2-Level auch im Phänotyp der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen der drei Ökotypen niederschlägt.

Die Keimlinge wurden nach Stratifikation und anschließender Keiminduktion für vier Tage verschiedenen Blaulichtintensitäten ( $0\text{--}30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) ausgesetzt. Anschließend wurden die Hypokotyllängen gemessen und die Mittelwerte ( $n=20$ ) miteinander verglichen (Abb. 4.23). Wie bereits zuvor beobachtet zeigte der Ökotyp RLD bereits im Dunkeln ein geringeres Hypokotyllängenwachstum als die anderen beiden Ökotypen (siehe auch Abb. 4.20). Die durchschnittliche Hypokotyllänge von RLD lag bei ca. 7 mm, während Col-0 und Ler eine  $\varnothing$  Hypokotyllänge von 12 mm erreichten. In den niedrigen Fluenzratenbereichen ( $0.01$ ,  $0.1$  und  $1\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) war die Hypokotyllänge von RLD stets um ca. 3 bis 4 mm geringer als die der beiden anderen untersuchten Ökotypen Col-0 und Ler. Erst bei steigender Fluenzrate ( $5$ ,  $10$  und  $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) unterschieden sich die ermittelten Hypokotyllängen zwischen RLD und



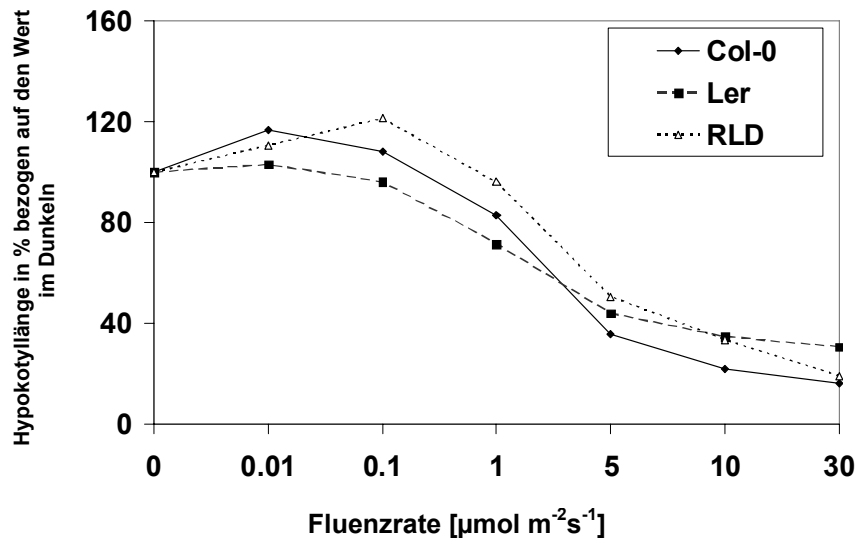
**Abb. 4.23** Vergleich der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen der Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) unter verschiedenen Fluenzraten (471 nm, 2 h).

Col-0 nicht mehr, wohingegen der Ökotyp Ler in diesem Fluenzratenbereich eine geringere Sensitivität besaß und eine größere Hypokotyllänge aufwies.

Ein Vergleich der Kinetik der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums der einzelnen Ökotypen bezogen auf die jeweiligen Hypokotyllängen im Dunkeln ergab, dass die einzelnen Ökotypen sich in Ihrer jeweiligen Sensitivität gegenüber verschiedenen Fluenzraten von Blaulicht nicht unterscheiden (Abb. 4.24).

So wiesen alle drei Ökotypen einen ähnlichen Kurvenlauf in der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums bei steigender Fluenzrate auf. In den niedrigen (*very-low*) Fluenzraten von 0.01 und 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  war die ermittelte Hypokotyllänge der Ökotypen Col-0 und RLD gering höher bezogen auf die Hypokotyllänge im Dunkeln (ca. 110-120%). Beim Ler Ökotyp entspricht sie der Hypokotyllänge im Dunkeln. Bei steigender Fluenzrate (1 bis 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) stieg auch das Ausmaß der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums, wobei sich die einzelnen Ökotypen jedoch in der prozentualen Abnahme der Hypokotyllänge nur unwesentlich unterschieden. So lagen die Hypokotyllängen bei einer Fluenzrate von 1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  von allen drei Ökotypen bei ca. 80% und bei einer Fluenzrate von 5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bei ca. 40% der jeweiligen Ausgangshypokotyllänge im Dunkeln. Bei einer Fluenzrate von 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wies der Ler Ökotyp mit einer Hypokotyllänge von immer noch 40% eine etwas geringere Sensitivität als

die beiden anderen Ökotypen Col-0 und RLD auf, die bei ca. 30% der Hypokotylllänge bezogen auf die jeweilige Dunkelkontrolle lagen.



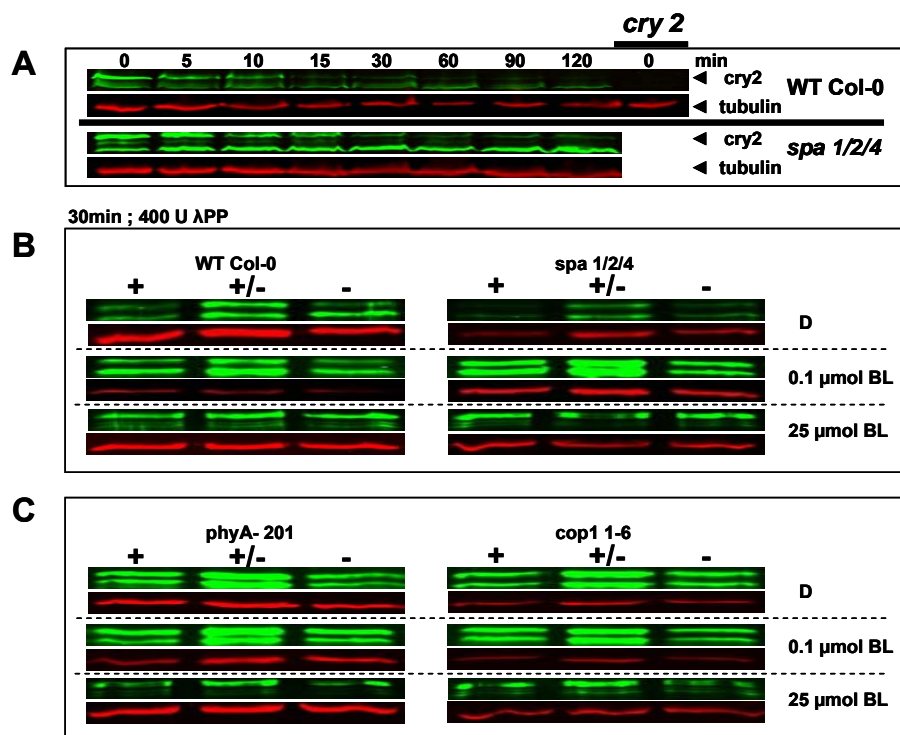
**Abb. 4.24 Kinetik der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums der verschiedenen Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reschew* (RLD) bezogen auf die Dunkelkontrolle.** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=20$ ) der Hypokotyllängen prozentual bezogen auf die jeweiligen Hypokotyllängen der im Dunkeln angezogenen Keimlinge (0=100%).

#### 4.2.10 Untersuchung über den Phosphorylierungszustand von CRY2 nach Blaulichtbestrahlung

Während der immunologischen Nachweise der Degradation von CRY2 unter Blaulicht in verschiedenen Genotypen über die Zeit wurde teilweise eine weitere CRY2 Bande beobachtet, die sich oberhalb des CRY Signals von Dunkelproben befand (Abb. 4.25 A). Ausgehend von der Vermutung, dass es sich bei dieser Bande in den Lichtproben um die phosphorylierte Form von CRY2 handeln könnte, wurden die Proteingestamtextakte von Blaulicht-bestrahlten Keimlingen verschiedener Genotypen mit  $\lambda$ PP Phosphatase, bzw. zur Kontrolle ohne  $\lambda$ PP Phosphatase inkubiert. Als zusätzliche Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit  $\lambda$ PP Phosphatase und mit dessen Inhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend im SDS Gel aufgetrennt und immunologisch mit  $\alpha\text{CRY2}$  Antiserum auf CRY2 hin detektiert.

Abbildung 4.23 A zeigt den immunologischen Nachweis von CRY2 in Proben von Keimlingen, die für 2 h mit Blaulicht bestrahlt worden waren. Die Probe aus etiolierten *cry2* Mutante Keimlingen zeigte wie erwartet kein CRY2 Signal. Die Untersuchung ob es sich bei der zusätzlichen CRY2 Bande um eine phosphorylierte Form des Proteins handelt, erfolgte

nach Blaubelichtung der Keimlinge mit Fluenzraten von 0.1 und 25  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sowie in einer Dunkelprobe. Es wurden hierfür Keimlingen der Genotypen Col-0 WT und *spa 1/2/4* im Col-0 Hintergrund (Abb. 4.25 B) und von *phyA-201* und *cop1 1-6* (Abb. 4. 25 C) verwendet. Der immunologische Nachweis von CRY2 erfolgte in Proteinextrakten dieser Genotypen nach der jeweiligen Inkubation mit (+) bzw. ohne  $\lambda\text{PP}$  Phosphatase (-) sowie nach Inkubation mit  $\lambda\text{PP}$  Phosphatase und dem Inhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (+/-). Sowohl in den Proteinextrakten der Dunkelkontrolle (D) wie auch in den Proben, die mit Blaulicht von 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bestrahlt worden waren, wurde nur ein geringer Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt. Der immunologische Nachweis von CRY2 zeigte unabhängig von der vorherigen Inkubation mit oder ohne  $\lambda\text{PP}$  Phosphatase bzw. mit Zusatz des Inhibitors (+;+/-;-) ein zweites Signal für CRY2. Es zeigte sich außerdem und entgegen den bekannten Literaturdaten (Yang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), dass die durch Phosphorylierung hervorgerufene zweite CRY2 Bande schon im Dunkeln und somit unabhängig von der Blaulichtbelichtung detektiert werden konnte (Abb. 4.25 A (0min); Abb. 4.25 B und C (D und 0.1  $\mu\text{mol BL}$ )).



**Abb. 4.25 Immunologische Nachweise von CRY2 in Proteingesamtexttrakten mit und ohne Phosphatase-Behandlung.** **A** Immunologischer Nachweis der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 Protein im WT Col-0 und in der *spa 1/2/4* Mutante mit  $\alpha\text{CCT2}$  Antiserum (grün) und von Tubulin mit  $\alpha\text{Tubulin}$  Antiserum (rot) über die Zeit. Tubulin diente als jeweilige interne Ladekontrolle und die Analyse der *cry2* Mutante als Kontrolle der Spezifität der detektierten Signale von CRY2. **B** Immunologischer Nachweis von CRY2 im WT Col-0 und in der *spa 1/2/4* Mutante mit (+) und ohne (-)  $\lambda\text{PP}$  Phosphatase, bzw. mit  $\lambda\text{PP}$  Phosphatase und deren Inhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (+/-) (New England BioLabs; Ipswich, MA). Die Inkubation der Ansätze erfolgte nach Blaulichtbelichtung mit unterschiedlichen Fluenzraten (BL) oder im Dunkeln (D). **C** Gleiche Behandlung und Nachweis wie in (B) in den Mutanten *phyA-201* und *cop1 1-6*.



Die geringen Signalstärken von CRY2 in der *spa 1/2/4* Mutante in den Proben (+) und (-) sind möglicherweise auf Pipettierfehler zurückzuführen, da auch das entsprechende Tubulinsignal schwach ausgeprägt war.

Der immunologische Nachweis des CRY2 Signals aus den Proteinextrakten unter Blaulichtbelichtung im hohen Fluenzratenbereich ( $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) wies unabhängig von der vorherigen Behandlung (+;+/-;-) ebenfalls keinen direkten Unterschied zwischen den einzelnen getesteten Genotypen auf. Auffällig war jedoch hier, dass die untere CRY2 Bande eine deutlich geringere Signalintensität hatte im Vergleich zu den Intensitäten in den zuvor untersuchten Probe der Dunkelprobe bzw. des Ansatzes des niedrigen (*very-low*) Fluenzratenbereich. Eine Erhöhung der Inkubationszeit bzw. der Menge an eingesetzter  $\lambda$ PP Phosphatase führte ebenfalls zu keinem „shift“ des oberen möglichen phosphorylierten Signals von CRY2 (Daten nicht gezeigt). Die hier gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass das detektierte zweifache Signal nicht einer möglichen unphosphorylierten und phosphorylierten Form von CRY2 entsprach. Dies wurde ebenfalls dadurch bestätigt, dass CRY2 in 2 Banden in der Dunkelprobe nachweisbar war, entgegen den bekannten Daten aus der Literatur. Die blaulichtabhängige Phosphorylierung von CRY2 konnte durch eine Behandlung mit  $\lambda$ PP Phosphatase daher nicht gezeigt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1. Blaulichtabhängiger Abbau von Cryptochrom 2

Die unterschiedliche Lichtsensibilität der einzelnen Photorezeptoren und die daraus resultierende unterschiedlich schnelle Aktivierung und/oder Degradation dieser ermöglicht es Pflanzen, auf verschiedene Lichtverhältnisse flexibel zu reagieren. Dieser Regulationsmechanismus erlaubt eine optimale Anpassung der Pflanze an die sie umgebenden Umweltgegebenheiten.

Die Unterschiede der einzelnen Photorezeptoren in ihrer Lichtstabilität sind schon länger bekannt. So ist Phytochrom A (phyA) gegenüber Rotlichtbestrahlung im Gegensatz zu den anderen Phytochromen (phyB-E) sensitiver und wird lichtabhängig abgebaut (Clough and Viestra, 1997; Clough *et al.*, 1999; Sharrock and Clack, 2002). Aktuellere Daten zeigen für phyB ebenfalls eine lichtabhängige Degradation nach konstanter Rotlichtbestrahlung (Leivar *et al.*, 2008). Ein Unterschied in der Lichtstabilität zeigt sich auch bei den Cryptochromen. So ist CRY1 lichtstabil, während CRY2 nach Blaulichtbestrahlung schnell abgebaut wird (Ahmad *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2007).

Die beiden lichtsensitiven Photorezeptoren phyA und CRY2 haben eine dominante Rolle bei der photoperiodischen Blühinduktion (Guo *et al.*, 1998; Mockler *et al.*, 2003; Hayama und Coupland, 2004; Searle und Coupland, 2004). Dieser Einfluss beruht wahrscheinlich auf der Oszillation ihrer Proteinmengen im wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus und unterstreicht, dass ihre Aktivierung und eine damit einhergehende phosphorylierungsabhängige Proteindegradation für ihre Funktion zur Perzeption der Tageslänge wichtig sind (Mockler *et al.*, 2003). Die Lichtstabilität der anderen Photorezeptoren schließt jedoch nicht aus, dass sie auch an der Regulation der Blühinduktion beteiligt sind. So konnte eine Studie zeigen, dass CRY1 ebenfalls einen Einfluss auf die Blühinduktion besitzt, obwohl die Menge an CRY1-Protein nicht lichtabhängig fluktuiert (Mockler *et al.*, 2003). Eine hyperaktive *cry1*-Mutante (*cry1-L407F*), die in ihrem CRY1 Gehalt nicht beeinflusst und ebenfalls lichtunabhängig ist, zeigte frühzeitiges Blühen im Kurztag (Exner *et al.*, 2010). Somit scheint auch CRY1 einen Einfluss auf die Blühinduktion zu haben. Die Gehalte an CRY2-Protein sind abhängig von der Tageslänge. So ist unter Kurztag-Bedingungen eine starke, unter Langtag Bedingungen keine bzw. nur eine schwache Oszillation des CRY2-Proteinlevels zu beobachten. Dies würde eine Regulation der Blühinduktion in einem Zusammenspiel von CRY1, einem lichtstabilen Photorezeptor, und CRY2, einem lichtlabilen Photorezeptor ermöglichen.

Die blaulichtabhängige Degradation von CRY2 wurde bisher schon eingehend untersucht. Dabei wurde ebenfalls ein Zusammenhang von der Geschwindigkeit der Degradation in Abhängigkeit von der Fluenzrate festgestellt (Ahmad *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Andere Lichtqualitäten als Blaulicht haben keinen Einfluss auf die Stabilität von CRY2.

Für die Auswertungen der verschiedenen Versuche bzw. Western Blots wurde das LI-COR Odyssey System genutzt. Dieses System hat gegenüber ECL-Western verschiedene Vorteile. So ist die anschließende Quantifizierung unabhängig von der Entwicklungszeit der herkömmlichen ECL-Western und die für die Auswertung störenden Hintergrundsignale werden automatisch von der Software herausgerechnet. Des Weiteren können unterschiedliche Proteinkonzentrationen simultan untersucht werden ohne dass hohe Proteinkonzentrationen geringe Proteinkonzentrationen und umgekehrt, Schwierigkeiten bei der Auswertung verursachen, was bei ECL-Western oft der Fall ist. Als letztes ist noch der Vorteil der zweifachen bzw. mehrfachen Immunodetektion zu nennen, da das System bei der Auswertung der Daten die Möglichkeit bietet, zwischen den einzelnen Kanälen zu wechseln und jedes Antikörpersignal so im Einzelnen ausgewertet werden kann. Um die Aussagekraft der in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse abzusichern, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Die Ermittlung der quantitativen Werte der CRY2 Degradation erfolgte durch Analyse von Proteingestamtexttrakten mittels Immunodetektion und folgender Normierung der Signalstärken mittels der internen Ladekontrolle des Tubulinsignals. Bei der Erstellung einer Eichgerade für die gemessene Signalintensität in Relation zu der aufgetragenen Proteinmenge (Abb. 4.16 B) zeigt sich, dass die gemessene Signalintensität, Grundlage für die quantitative Analyse, in linearem Bezug zu der eingesetzten Proteinmenge steht. Des Weiteren war der verwendete Antikörper spezifisch für CRY2, da bei Analyse einer *cry2*-Mutante kein Signal detektiert werden konnte (Abb. 4.12 B und Abb. 4.16 A).

Daher beziehen sich die nachfolgenden diskutierten Ergebnisse auch immer nur auf den relativen Proteinlevel von CRY2.

Konsistent mit veröffentlichten Daten wurde eine schnelle Degradation von CRY2 unter Blaulicht bei einer konstanten Fluenzrate von  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  beobachtet (Abb. 4.12 A). So ist nach 10 min die detektierte Menge an CRY2-Protein bereits deutlich reduziert und nach 30 min ist nur noch ein Bruchteil des Ausgangsgehalts der Dunkelkontrolle vorhanden. Nach 60 min Blaubelichtung konnte fast kein CRY2 Protein mehr in den Proteingestamtexttrakten der Wildtyp Keimlinge detektiert werden. Nach zweistündiger Blaulichtbelichtung waren im niedrigen Fluenzratenbereich ( $0.01$  und  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) die noch vorhandene Menge an CRY2 deutlich höher als im höheren Fluenzratenbereich ( $> 1 - 30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Neben der Untersuchung von Wildtyp Pflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mutanten hinsichtlich Abbau von CRY2 analysiert, um einen möglichen Einfluss dieser Gene bzw. der durch sie kodierten Proteine auf den Abbau von CRY2 aufzuklären.

Hierbei konnte unter anderem ein Effekt von Phytochrom A (*phyA*) auf die Stabilität von CRY2 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Arbeiten von Yu *et al.*, (2007) wurde ein Einfluss von *phyA* auf den Abbau von CRY2 beobachtet. Die *phyA-211* Mutante im Col-0 Hintergrund

zeigte im Gegensatz zum Wildtyp eine verlangsamte Degradation von CRY2, die sowohl blaulicht- wie auch fluenzratenabhängig war (Abb. 4.13 A). So war in der *phyA-211* Mutante die detektierte Menge an CRY2 Protein unter niedrigen Fluenzraten ( $0.01$ ,  $0.1$  und  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) deutlich höher als im Wildtyp und auch bei höherer Fluenzrate ( $> 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) war CRY2 in der *phyA* Mutante im Gegensatz zum Wildtyp noch detektierbar. Derselbe Effekt konnte in einer weiteren *phyA-201* Mutante im *Landsberg erecta* (Ler) Hintergrund beobachtet werden (Abb. 4.13 B). Die quantitative Analyse des Abbaus von CRY2 in der *phyA-211* Mutante verglichen mit dem Col-0 WT (Abb. 4.14 B) zeigte einen signifikanten Unterschied im niedrigen Fluenzratenbereich ( $0.01$  und  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), während der Unterschied im höheren Fluenzratenbereich ( $> 1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) nicht signifikant war. Die *phyA-201* Mutante zeigte hingegen keinen so starken Unterschied im niedrigen Fluenzraten Bereich verglichen mit dem Ler WT (Abb. 4.14 C). Diese Ergebnisse liefern auch eine mögliche Erklärung dafür, dass Yu *et al.* (2007) keinen sichtbaren Effekt der Phytochrome auf die Stabilität von CRY2 feststellen konnten. Die in ihrer Analyse verwendete Fluenzrate betrug  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ein Bereich in dem auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den *phyA* Mutanten und dem entsprechenden Wildtyp detektierbar war. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich der Einfluss von Phytochrom A auf die Stabilität von CRY2 auf den niedrigen Fluenzratenbereich beschränkte. Die unter Rotlicht bzw. Dunkelrotlicht durchgeführten Kontrollen zeigten zudem, dass dieser Phytochrom A Effekt spezifisch blaulichtabhängig war (Abb. 4.17). Sowohl in der *phyA-201* Mutante wie auch in dem entsprechenden WT Ler konnte unter Rot- und Dunkelrotlicht keine Degradation von CRY2 beobachtet werden. Somit scheint die Aktivierung von CRY2 durch Blaulicht notwendig zu sein um den beobachteten Einfluss von *phyA* auf den Abbau von CRY2 zu regulieren. Der signifikante Unterschied im niedrigen Fluenzraten Bereich im Hinblick auf die Degradation von CRY2 spricht für eine spezifische *phyA* Antwort also einer *very low fluence response* (VLFR), abhängig von der Intensität des einfallenden Lichts.

Neben dem blaulichtabhängigen Phytochrom A Effekt auf den Abbau von CRY2 konnte dieser Effekt auch in der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen beobachtet werden. So war unter konstantem Blaulicht das Hypokotyl in der Dreifachmutante *phyA/cry1/cry2* länger als in der *cry1/cry2* Doppelmutante (Abb. 4.20). Daraus lässt sich schließen, dass neben den beiden Cryptochromen CRY1 und CRY2 auch *phyA* einen Effekt auf die blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums besitzt. Anders als der bereits oben erwähnte Einfluss von *phyA* unter niedrigen Fluenzraten ( $0.01$  bzw.  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) auf die Degradation von CRY2, konnte hier auch ein Einfluss von *phyA* unter einer hohen Fluenzrate ( $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) beobachtet werden. Diese Befunde sind konsistent zu den bereits in der

Literatur beschriebenen blaulichtabhängigen Phytochrom-Effekten, wie Inhibition des Hypokotyllängen Wachstums (Shinomura *et al.*, 1996), die Expansion der Kotyledonen (Neff und Chory, 1998), sowie die Inhibierung der Ergrünung der Wurzeln (Usami *et al.*, 2004). Insgesamt lassen die Daten der Stabilität von CRY2 und der lichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängen Wachstums einen *cross-talk* zwischen Phytochrom A und Cryptochrom 2 in einem gemeinsamen blaulichtabhängigen Signalweg vermuten. Die Phytochrom A abhängige Degradation von CRY2 unter Blaulicht könnte möglicherweise über eine direkte Interaktion beider Proteine verlaufen oder aber über einen dritten Interaktionspartner, wie z.B. COP1. Eine direkte, über den C-Terminus von CRY2 (CCT2) vermittelte Interaktion mit COP1 konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2001). Somit wäre eine Interaktion beider Photorezeptoren phyA und CRY2 reguliert über COP1 mit ihrer jeweiligen Signal weiterleitenden C-terminalen Domänen ebenfalls denkbar.

Um zu prüfen, ob noch weitere Phytochrome einen blaulichtabhängigen Einfluss auf die Stabilität von CRY2 auf Proteinebene haben, wurde zusätzlich die *phyB-5* Mutante im Ler Hintergrund unter verschiedenen Fluenzraten untersucht (Abb. 4.13 B). Die quantitative Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Degradation von CRY2 im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (Abb. 4.14 C). Somit kann anhand der hier vorliegenden Daten ein Einfluss von Phytochrom B unter Blaulicht auf die Stabilität von CRY2 ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zur Analyse der *phyA-211* Mutante im Col-0 Hintergrund und der *phyA-201* Mutante im Ler Hintergrund wurde eine weitere *phyA-101* Mutante im Hintergrund des Ökotyps *Reschew* (RLD) untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass zwischen den untersuchten *phyA*-Mutanten und den entsprechenden Wildtypen ein Unterschied in der blaulicht- und fluenzratenabhängigen Degradation von CRY2 bestand, obwohl alle drei untersuchten Mutanten *phyA*-Null-Allele trugen. So ist der Effekt einer verlangsamten CRY2-Degradationsrate bei Abwesenheit von Phytochrom A in der *phyA-211*-Mutante im Col-0 Hintergrund am stärksten (Abb. 4.14 B). Die *phyA-201* Mutante im Ler Hintergrund zeigte immer noch einen signifikanten Unterschied im niedrigen Fluenzratenbereich (Abb. 4.14 C), wohingegen in der *phyA-101*-Mutante im RLD Hintergrund (Abb. 4.14 D) nahezu kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die bereits in den Wildtypen der drei Ökotypen Col-0, Ler und RLD beobachtete unterschiedlich starke CRY2-Degradation im niedrigen Fluenzratenbereich von  $0.01\text{-}1\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Abb. 4.15). Beide Ökotypen, RLD und Ler, zeigten eine langsamere Degradation von CRY2 als der Col-0 Ökotyp. Um zu überprüfen, ob die Ursache an einer generell höheren Sensitivität des Col-0 Ökotyps im Vergleich zum Ler bzw. RLD Ökotyp gegenüber Blaulicht lag, wurde zusätzlich die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums unter verschiedenen Fluenzraten untersucht (Abb. 4.23 und 4.24). Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied

zwischen den einzelnen Ökotypen betreffend ihrer Sensitivität gegenüber Blaulicht gemessen an der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums. Die absolute Hypokotyllänge der beiden Ökotypen Col-0 und Ler war im Vergleich zu der Hypokotyllänge des RLD Ökotyps insgesamt zwar höher (Abb. 4.23), aber ein quantitativer Vergleich der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums gegenüber den getesteten Fluenzraten zeigte keinen Unterschied in der relativen Abnahme der Hypokotyllänge bezogen auf die entsprechenden Dunkelkontrollen in allen drei untersuchten Ökotypen (Abb. 4.24). Somit korreliert die erhöhte Degradationsrate von CRY2 unter Blaulicht im Col-0 Ökotyp im Vergleich zu den Ökotypen Ler und RLD (Abb. 4.15) nicht mit einer generell erhöhten Sensitivität gegenüber den untersuchten Fluenzraten. Ein Grund für die verminderte Degradation von CRY2 im niedrigen Fluenzratenbereich im RLD Ökotyp, könnte die für den RLD Ökotyp beobachtete Dunkelreversion von Phytochrom A sein (Eichenberg *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den Ökotypen Col-0 und Ler konnte für den RLD Ökotyp eine Dunkelreversion des ansonsten lichtlabilen und lichtabhängig degradierten phyA nachgewiesen werden. Somit könnte die aufgrund der Dunkelreversion geringere Konzentration an aktiver Pfr-Form von phyA im RLD Ökotyp gegenüber den beiden anderen untersuchten Ökotypen Ler und Col-0 ein Grund für die beobachtete verringerte blaulichtabhängige CRY2-Degradation gegenüber den beiden anderen untersuchten Ökotypen Ler und RLD sein.

Des Weiteren wurde der Gesamtgehalt an CRY2 in den drei Ökotypen Col-0, Ler und RLD im Hinblick auf mögliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Tages-Rhythmik unter Langtag- und Kurztag-Bedingungen untersucht. Die Analyse des CRY2-Proteinlevels von zwei Wochen alten, im Kurztag angezogen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen über einen Zeitraum von 24 h zeigte keinen wirklich signifikanten Unterschied zwischen den drei untersuchten Ökotypen Col-0, Ler und RLD (Abb. 4.21 B). Insgesamt zeigte sich in der quantitativen Analyse, dass der CRY2 Proteinlevel im Kurztag im RLD Wildtyp, bezogen auf die Dunkelkontrolle über einen Zeitraum von 24 Stunden geringer war, als in den Ökotypen Col-0 und Ler (Abb. 4.22 A). Die Kinetik Analyse der Degradation von CRY2 zeigte jedoch in allen drei Ökotypen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Bei der Betrachtung der CRY2 Proteinlevel in den unter Langtag-Bedingungen angezogenen Pflanzen konnte für den RLD Ökotyp eine Tages-Rhythmik in Bezug auf die Degradation und Akkumulation von CRY2 beobachtet werden (Abb. 4.22 B). Im Gegensatz dazu zeigten die Ökotypen Col-0 und Ler keine Tages-Rhythmik des CRY2-Proteinlevels unter Langtag-Bedingungen. Jedoch dauerte die Akkumulation von CRY2 auf den Ausgangsproteinlevel im Dunkeln nach einer Weißlichtphase im Col-0 Ökotyp länger verglichen zum Ler Wildtyp. Grundsätzlich sind die Daten dieser Analyse aber nicht aussagekräftig genug, um einen klaren Unterschied der einzelnen Ökotypen in der Regulation ihres CRY2-Proteinlevels zu postulieren, da die

Ergebnisse bis jetzt nur aus einer Messung resultierten und weitere Wiederholungen des Experiments notwendig sind.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Degradation von CRY2 ist die vorausgehende Phosphorylierung von CRY2. Der proteasomalen Degradation durch das 26S Proteasom im Nukleus geht eine Phosphorylierung und Ubiquitinierung von CRY2 (Yu *et al.*, 2007, 2009) unter Beteiligung der E3 Ligase COP1 (*constitutively photomorphogenic 1*) voraus (Shalitin *et al.*, 2002). In den Mutanten *cop1-4* und *cop1-6*, beides keine Null-Allel-Mutanten, ist die Degradation von CRY2 stark reduziert aber nicht komplett unterdrückt. Auch in der Null-Allel-Mutante *cop1-5* ist die CRY2-Degradation ebenfalls vermindert, findet aber immer noch statt (Shalitin *et al.*, 2002). Die Analyse der *cop1-6*-Mutante im Rahmen dieser Arbeit zeigte wie erwartet ebenfalls besonders im niedrigen Fluenzratenbereich eine verlangsamte aber keine vollständiges Ausbleiben der Degradation von CRY2 unter Blaulicht (Abb. 4.14 B) verglichen zu dem entsprechenden Wildtyp Hintergrund Col-0. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass noch andere Komponenten des E3 Ligase-Komplexes bei der Degradation von CRY2 eine Rolle spielen. Die Bedeutung von COP1 scheint redundant zu sein und eine vollständige Degradation von CRY2 resultiert wahrscheinlich nur im Zusammenspiel von COP1 mit anderen Faktoren. Mögliche Faktoren wären Mitglieder der SPA-Protein-Familie (SPA1-4), da eine *spa*-Vierfachmutante, defekt in allen vier SPA-Proteinen, einen ausgeprägten *cop*-Phänotyp aufweist (Übersicht in Hoecker *et al.*, 2005).

In der Tat zeigte eine Analyse der CRY2-Degradation unter konstantem Blaulicht über die Zeit eine verminderte Degradation von CRY2 in der Dreifachmutante *spa1/2/4* im Vergleich zum Col-0 Wildtyp (Abb. 4.12). Im Gegensatz zum Wildtyp Col-0 konnte in der *spa 1/2/4* Mutante nach 180 min immer noch eine größere Menge an CRY2-Protein detektiert werden. Die quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten bestätigte diese verlangsamte Degradation von CRY2 in der *spa1/2/4*-Mutante (Abb. 4.12 C und D). Um die Rolle der einzelnen vier SPA Proteine bei der CRY2-Degradation im Einzelnen zu verifizieren und eine mögliche Abhängigkeit von der Fluenzrate zu überprüfen, wurde die Degradation von CRY2 unter verschiedenen Fluenzraten in verschiedenen *spa*-Mutanten untersucht. Ein starker Unterschied im Abbau von CRY2 unter Blaulicht im niedrigen Fluenzratenbereich ( $0.01\text{-}1\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) konnte bei allen getesteten *spa*-Mutanten im Unterschied zu Col-0 Wildtyp festgestellt werden, wohingegen im höheren Fluenzratenbereich ( $> 5\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (Abb. 4.13 und 4. 14 A). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der SPA-Proteine an der Degradation von CRY2 hin. Eine Möglichkeit wäre, dass die SPA-Proteine zusammen mit COP1 den Abbau von CRY2 regulieren und somit indirekt auch die CRY2-vermittelten Prozesse im Zusammenspiel mit COP1 steuern. Die SPA-Proteine könnten somit an der Blaulichtantwort von CRY2 beteiligt

sein, indem sie dessen Konzentration auf Proteinebene regulieren. Die immer noch sichtbare aber verlangsamte Degradation von CRY2 in den *cop* Mutanten (Shalitin *et al.*, 2002), die auch hier in der *cop1-6* Mutante beobachtet wurde sowie in der Vierfachmutante *spa1/2/3/4* resultierte wahrscheinlich daraus, dass in den jeweiligen Mutanten einer der Komponenten des COP1/SPA-Komplexes funktionsfähig ist und somit die Degradation von CRY2 in den Mutanten nicht komplett gehemmt war. Untersuchungen mit verschiedenen *spa*-Mutanten zeigten, dass die vier SPA Proteine mit COP1 unabhängig von einander in unterschiedlicher Zusammensetzung verschiedene Komplexe bilden können und die Menge an COP1 nur bei Abwesenheit von SPA3 und SPA4 geringfügig reduziert ist (Zhu *et al.*, 2008). Dies spricht ebenfalls für die Tatsache, dass bei den untersuchten Mutanten trotz der Abwesenheit von COP1 bzw. der Spa Proteine ein Abbau von CRY2 beobachtet werden konnte. Um zu prüfen, ob COP1 und die SPA-Proteine die essentiellen Komponenten der Degradation von CRY2 sind, wäre eine Analyse einer *cop1-5/ spa1/2/3/4*-Mutante notwendig. Eine andere Möglichkeit wäre die Beteiligung einer weiteren von SPA und COP1 unabhängigen Ubiquitin-Ligase an der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2.

Um die Bedeutung der einzelnen SPA-Proteine zu verifizieren, wurden wie oben schon erwähnt neben einer *spa1* Einfachmutanten und der Vierfachmutante *spa1/2/3/4* noch verschiedene Dreifach-*spa* Mutanten im Col-0 Hintergrund untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass SPA1 vermutlich eine dominante Rolle in der CRY2-Degradation hat. Die *spa1* Mutante zeigte die gleiche verlangsamte Degradation von CRY2 wie die verschiedenen Dreifach und die Vierfach-*spa* Mutanten. Dass die Dreifach-*spa2/3/4* Mutante, die funktionstüchtiges SPA1 besitzt, eine gleiche verlangsamte Degradation von CRY2 zeigte, kann mit einer möglichen Redundanz und einer teilweisen Kompensation durch andere SPA-Proteine erklärt werden. Für den Abbau von CRY2 im hohen Fluenzratenbereich scheinen die SPA-Proteine nicht essentiell zu sein, da sowohl die Dreifachmutanten als auch die Vierfach-null Mutante von *spa* eine gleiche CRY2-Proteinmenge wie der Col-0 Wildtyp aufwies (Abb. 4.14 A). Allein die *spa1/2/3*-Mutante verhielt sich abweichend zu der vorher beschriebenen verlangsamten Degradation von CRY2 im niedrigen Fluenzratenbereich. Die quantitative Analyse zeigte, dass die Degradation von CRY2 im niedrigen Fluenzratenbereich ähnlich stark ausgeprägt ist wie im Wildtyp und deutlich weniger CRY2-Protein aufwies, als die anderen untersuchten *spa*-Mutanten. Im hohen Fluenzratenbereich (10 und 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) dagegen konnte ein deutlich höheres Level an CRY2 Protein nachgewiesen werden als im entsprechendem Col-0 Wildtyp sowie auch im Vergleich zu den anderen untersuchten *spa* Mutanten (Abb. 4.14 A). Dies lässt den Schluss zu, dass SPA4 im hohen Fluenzratenbereich eine dominante Rolle in der Regulation von der Stabilität von CRY2 besitzen könnte. Da aber in der *spa1/2/3/4* Vierfachmutante dieser Effekt nicht beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen



werden, das sich die SPA-Proteine antagonistisch in einer fluenzratenabhängigen Weise untereinander in ihrer Aktivität regulieren können. Neben der redundanten Funktion in der Regulation der CRY2-Stabilität, haben die einzelnen SPA-Proteine noch einen unterschiedlich großen Einfluss auf verschiedene Entwicklungsprozesse der Pflanze. So sind SPA1 und SPA2 wichtige Faktoren in der Repression der Photomorphogenese im Dunkeln, während SPA3 und SPA4 eine Rolle bei der Entwicklung von Keimlingen und adulten Pflanzen im Licht haben (Laubinger *et al.*, 2004; Fittinghoff *et al.*, 2006). Da die Blaulicht-induzierte Degradation von CRY2 ein Teil des De-Etiolierungsprozesses von Pflanzen ist, könnte eine dominante Rolle von SPA1 und SPA2 im Degradationsprozess von CRY2 angenommen werden. Der beobachtete Effekt, dass bei Abwesenheit von funktionsfähigem SPA1 die CRY2-Degradation verlangsamt war, unterstützt diese Vermutung. Des Weiteren zeigte aber die Analyse der *spa2/3/4* Dreifachmutante, dass die Degradation von CRY2 nicht alleine von SPA1 vermittelt wird und auch alleine nicht ausreicht, um eine Erklärung für die Sensitivität von CRY2 gegenüber von Blaulicht zu geben. Ähnlich verhält es sich mit SPA2. Die Analyse der *spa 1/3/4* Dreifachmutante zeigte ebenso eine erhöhte Menge an CRY2-Protein im Vergleich zum Wildtyp im niedrigen Fluenzratenbereich unter Blaulicht. Somit könnte die Funktion von SPA2 in der Degradation von CRY2 redundant und zu anderen SPA Proteinen sein. Für die SPA3- und SPA4-Proteine konnte bei der Untersuchung der entsprechenden Mutanten (*spa1/2/4* und *spa 1/2/3*) festgestellt werden, dass beide, SPA3 und SPA4, alleine nicht ausreichen, um die Degradation von CRY2 zu vermitteln. Der bereits beschriebene Unterschied in der *spa1/2/3*-Mutante in der Degradation von CRY2 unter niedrigen und hohen Fluenzraten im Vergleich zu den anderen *spa* Mutanten lässt aber eine dominante Rolle für SPA4 in diesem Prozess vermuten. Vor allem im hohen Fluenzratenbereich, indem ein signifikant höheres CRY2-Proteinlevel detektiert werden konnte, als im Col-0 Wildtyp und in den anderen *spa*-Mutanten, scheint SPA4 einen großen Einfluss auf die Stabilität bzw. Degradation von CRY2 zu haben. Zusammengefasst zeigt sich, dass die SPA-Proteine an der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 beteiligt sind und in einer fluenzratenabhängigen Weise sich gegenseitig im Prozess der Degradation regulieren und kompensieren können. Des Weiteren kann aufgrund der quantitativen Analysen der *spa1*-Mutante und der *spa1/2/3*-Dreifachmutante eine dominante Rolle im Abbau von CRY2 für SPA1 und SPA4 postuliert werden.

Die Untersuchung eines Effektes von Phytochrom A und SPA1 in der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 sollte durch Analyse der Einzelmutanten beider Proteine und einer *phyA-101/spa1-2* Doppelmutante erfolgen. Die Analyse der Doppelmutante *phyA-101/spa1-2* zeigte jedoch im Vergleich zu den Einzelmutanten *phyA* und *spa1-2* keinen Effekt. Im Bezug auf die Degradation von CRY2 konnte sowohl in den Einzelmutanten *phyA-101* und *spa1-2* wie auch in der Doppelmutante kein Unterschied im RLD Hintergrund festgestellt werden.

(Abb. 4.14 D). Dieses Ergebnis korreliert mit den bereits publizierten Daten, dass *phyA* *upstream* von SPA agiert (Hoecker *et al.*, 1998; Laubinger und Hoecker 2003; Fittinghoff *et al* 2006). Alle drei untersuchten Mutanten im RLD Hintergrund zeigten unter den getesteten Blaulichtfluenzraten eine gleiche CRY2 Degradationsrate verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp. Dass der Effekt eines verlangsamten Abbaus von CRY2 in den untersuchten Mutanten bei Abwesenheit von *phyA*, bzw. SPA1 im Vergleich zu den entsprechenden Mutanten im Col-0 bzw. Ler Hintergrund nicht beobachtet werden konnte, lag vermutlich an der bereits oben diskutierten unterschiedlichen fluenzratenabhängigen CRY2-Degradation in den verschiedenen Ökotypen. Grund hierfür war möglicherweise die geringere Sensitivität des RLD Ökotyps gegenüber Blaulicht im Hinblick auf Degradation von CRY2.

Die bereits aus der Literatur bekannte proteasomal-vermittelte Degradation im Col-0 Ökotyp von CRY2 (Yu *et al.*, 2007, 2009) wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls überprüft. Zusätzlich zum Col-0 Ökotyp wurden noch die Ökotypen Ler und RLD untersucht, um zu prüfen ob sich möglicherweise der proteasomale Abbau von CRY2 in den einzelnen Ökotypen unterscheidet, ähnlich wie die oben bereits diskutierte unterschiedlich schnelle blaulichtabhängige Degradation von CRY2. Unter Verwendung verschiedener Proteasominhibitoren wurde die Degradation von CRY2 unter Blaulicht in allen drei getesteten Ökotypen inhibiert (Abb. 4.19). Die Signalintensität des detektierten CRY2-Proteins war in Anwesenheit der Proteasominhibitoren zwar nicht genauso stark ausgeprägt wie in den entsprechenden Dunkelkontrollen, jedoch immer noch deutlich höher als ein entsprechender Ansatz unter Blaulicht ohne Verwendung von Proteasominhibitoren. Die Degradation von CRY2 bei Abwesenheit der eingesetzten Proteasominhibitoren unter Blaulicht konnte bei allen drei untersuchten Ökotypen beobachtet werden. Somit ist der Mechanismus der Degradation von CRY2 unter Blaulicht in allen analysierten Ökotypen über das Proteasom reguliert, jedoch unterscheiden sich die einzelnen Ökotypen hinsichtlich ihrer Sensivität gegenüber Blaulicht. Diese proteasomale Regulation des Abbaus von CRY2 spricht auch für eine Regulation der CRY2 Proteinmenge durch die verschiedenen SPA Proteine auf der Protein Ebene. Da bei Zugabe von verschiedenen Proteasom Inhibitoren kein Abbau von CRY2 beobachtet werden konnte ist eine Regulation von CRY2 auf der Transkriptmenge durch die SPA Proteine unwahrscheinlich. Da aber die Transkriptmenge von CRY2 in den untersuchten Mutanten nicht untersucht worden ist kann der Einfluss der SPA Proteine bzw. von *phyA* nicht ganz ausgeschlossen werden. Dagegen spricht aber die rasche Abnahme der CRY2 Proteinkonzentration nach Blaulicht Bestrahlung. Auch gibt es keine publizierten Befunde, die für eine Lichtkontrolle der Menge an CRY2 Transkripten spricht.

Ein weiterer Punkt, der Einfluss auf die unterschiedliche blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 in den beschriebenen Mutanten Genotypen und Ökotypen hat, ist die „Ausgangsmenge“ an CRY2. Es stellte sich die Frage, ob die Menge an CRY2, die im Dunkeln vorlag, sich in den einzelnen untersuchten Mutanten unterscheidet und somit eine Erklärung für die beobachtete unterschiedlich schnelle Degradation von CRY2 liefert. Dazu wurde der CRY2 Ausgangsproteingehalt der verschiedenen Mutanten mit dem entsprechenden WT Col-0 im Dunkel verglichen (Abb. 4.18). Eine quantitative Analyse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigte, dass der Ausgangsproteinspiegel von CRY2 in den untersuchten *cop1-6* und *phyA-201* Mutanten etwas höher lag als im WT Col-0. Die Menge an CRY2-Protein in den untersuchten Dreifachmutanten *spa1/2/3* sowie der Einzelmutante *spa1* war gleich der Menge an CRY2 im WT Col-0. In den Dreifachmutanten *spa1/3/4*, *spa2/3/4* und *spa1/2/4* zeigte die quantitative Analyse jedoch eine geringere Menge an CRY2-Protein im Vergleich zu dem WT Col-0. Ausgehend von diesen Ergebnissen könnte der oben diskutierte Befund, die verlangsamte Degradation von CRY2 in den *spa*-Mutanten, auch auf eine geringere „Ausgangsmenge“ an CRY2-Protein im Dunkeln zurückzuführen sein und nicht in Abhängigkeit zur eingesetzten Fluenzraten stehen. Der dargestellte immunologische Nachweis (Abb. 4.18 A) lässt in qualitativer Hinsicht keinen objektiven Unterschied im CRY2-Proteinlevel zwischen den untersuchten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Die quantitative Analyse aus zwei Messreihen zeigte nach Auswertung mittels T-Test erstens keine Signifikanz für die ermittelten Werte und wies zweitens einen hohen Standardfehler auf. Somit ist dieser berechnete Unterschied in der Ausgangsmenge an CRY2 Protein in den drei Dreifachmutanten als Argument gegen Beteiligung der SPA-Proteine an der blaulichtabhängigen Degradation von CRY2 zu vernachlässigen. Ob die SPA-Proteine einen Einfluss auf die Stabilität von CRY2 im Dunkeln unabhängig von Blaulicht besitzen, kann anhand der vorliegenden Daten aber nicht geklärt werden. Um zu ermitteln, wie stark die einzelnen CRY2-Level der untersuchten Mutanten im Dunkeln variieren und inwieweit diese Varianz sich auf die Geschwindigkeit der von fluenzratenabhängigen Degradation von CRY2 niederschlägt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 5.2 Cryptochrom 2 interagiert mit SPA1 und SPA4 *in vitro*

Die SPA-Proteine regulieren zusammen mit COP1 die Repression der Photomorphogenese. Es konnte *in vitro* über Co-Immunopräzipitation (Co-IP) Experimente gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von COP1 mit den vier verschiedenen SPA-Proteinen über die *coiled-coil* Domäne besteht (Hoecker und Quail, 2001; Sajio *et al.*, 2003; Laubinger *et al.*,

2004). Auch wurde gezeigt, dass aufgrund der Interaktion mit den SPA-Proteinen die Aktivität der E3 Ligase COP1 gesteigert werden kann (Seo *et al.*, 2003). Ferner konnte beobachtet werden, dass bei der Interaktion von SPA1 mit COP1 und anderen E1 und E2 Enzymen die Aktivität von COP1 gesenkt werden kann (Sajio *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit in der Domänenstruktur zwischen COP1 und den SPA-Proteinen sowie der direkten Interaktion von COP1 und CRY2, nachgewiesen *in vitro* (Wang *et al.*, 2001) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen den SPA-Proteinen und CRY2 *in vitro* untersucht. Da während der Anfertigung dieser Arbeit vorangegangene Expressionsversuche von rekombinantem COP1 in *E. coli*, sowie der Expression des C-Terminus von CRY2 nicht zu dem gewünschten Ergebnis führten (siehe 4.1 und 5.4), wurden für die angedachten Co-IPs die einzelnen *prey*-Proteine mit Hilfe des TnT-Reticulocyt-Lysat Systems (siehe 3.2.3.2.4) exprimiert. Als *bait*-Proteine fungierte volllängen CRY2, exprimiert in Insektenzellen (Sf21) mit N-terminalem His-Tag (His-CRY2), und als Negativkontrolle die *E. coli* DNA-Photolyase, exprimiert in *E. coli* mit N-terminalem His-Tag (His-*Ec*PHR). Alle *prey*-Proteine wurden in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin transkribiert und translatiert. Das eingesetzte rekombinante *bait*-Protein His-CRY2 wurde spektroskopisch nach der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA<sup>2+</sup>-Matrix auf die Anwesenheit des Chromophors FAD getestet (Abb. 4.11 A), zur Überprüfung der Aktivität bzw. Intaktheit des eingesetzten Photorezeptors. Des Weiteren war durch vorausgegangenen Arbeiten (Banjeree *et al.*, 2007) sichergestellt, dass His-CRY2 aus Insektenzellen einen Photozyklus durchführen kann. Für die Immunopräzipitation wurde αHis-Antiserum verwendet, und nicht αCRY2-Antiserum, um mögliche Interferenzen zwischen dem Antikörper und den verschiedenen *prey*-Proteinen für die C-terminal liegenden Bindungsstellen von CRY2 zu vermeiden. Die Spezifität des αHis-Antiserums wurde durch Vorversuche überprüft (Abb. 4.11 B). Hierbei zeigte sich nach der Immunopräzipitation von His-CRY2 Protein mit αHis-Antiserum und den verwendeten Dynabeads® Protein G, dass nur in der Pelletfraktion CRY2 in einem nachfolgenden immunologischen Nachweis mit αHis-Antiserum detektiert werden konnte. Das zur Kontrolle der Spezifität der Co-IPs verwendete *bait*-Protein His-*Ec*PHR wurde ebenfalls zuvor spektroskopisch auf die Anwesenheit der Chromophore FAD und MTHF überprüft (Abb. 4.11 A) und konnte anschließend nach Immunopräzipitation mit αHis-Antiserum ohne *prey*-Protein nur in der Pelletfraktion (P) immunologisch mit αHis-Antiserum nachgewiesen werden (Abb. 4.11 C). Zusätzlich zu den vier SPA-Proteinen wurden noch als Positivkontrolle COP1 und CIB1 als *prey*-Proteine, deren Interaktion mit CRY2 *in vitro* aus der Literatur bekannt ist (Wang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008a), sowie PIF3, welches noch nicht auf eine Interaktion hin untersucht worden ist, für die Co-Immunopräzipitation mit His-CRY2 verwendet. Alle Co-Immunopräzipitations Ansätze von His-CRY2 mit den vier SPA-Proteinen sowie mit COP1,

CIB1 und PIF3 wurden einmal im Weißlicht und einmal im Sicherheits-Rotlicht durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Co-IPs in Anwesenheit und in Abwesenheit von His-CRY2 durchgeführt, und von beiden Ansätzen die entsprechenden Pelletfraktion für den nachfolgenden autoradiographischen Nachweis verwendet.

Die durch autoradiographische Analyse mit Hilfe des Phosphoimagers detektierten Signale von SPA2 und SPA3 in beiden Pelletfraktionen der Co-IPs sind als unspezifisch anzusehen, weil diese unabhängig von der Anwesenheit (P+) bzw. Abwesenheit (P-) von His-CRY2 in gleicher Signalstärke detektiert worden sind (Abb. 4.10 A und B). Hingegen ist die Interaktion von His-CRY2 mit den Proteinen SPA1 und SPA4 spezifisch, da beide nur in den Pelletfraktionen der Co-IPs in Anwesenheit von His-CRY2 (P+) detektiert worden sind und kein Signal in den Ansätzen ohne His-CRY2 (P-) detektiert werden konnte. SPA1 und SPA4 interagieren mit His-CRY2 unabhängig von Blaulicht, da sich die Signalintensitäten zwischen dem Weißlicht- und Rotlicht-Ansätzen nicht unterschieden.

Um die Spezifität dieser Interaktion in diesem gewählten Ansatz zu überprüfen, wurden Co-IPs mit bereits für CRY2 bekannten bzw. *in vitro* nachgewiesenen Bindungspartnern durchgeführt. Diesen beiden Proteine, COP1 und CIB1, interagierten wie erwartet mit dem rekombinanten His-CRY2-Protein (Abb. 4.10 C und D). Für COP1 zeigte sich ebenfalls, dass die Interaktion mit His-CRY2, wie bereits in der Literatur beschrieben (Wang *et al.*, 2001) lichtunabhängig war, wie auch die oben erwähnte Interaktion von SPA1 und SPA4 mit His-CRY2. Die nach Co-IP mit His-CRY2 detektierten Signale von COP1 in den jeweiligen Pelletfraktionen der verschiedenen Ansätze im Weißlicht und im Rotlicht wiesen die gleiche Signalintensität auf. Für die Interaktion von His-CRY2 mit CIB1 konnte ein möglicher Rotlicht-Effekt in der Interaktion beider Proteine beobachtet werden (Abb. 4.10 D). Aus der Literatur war bisher lediglich bekannt, dass diese Interaktion blaulichtabhängig ist (Liu *et al.*, 2008a). Da die Signalstärke von CIB1 in der Pelletfraktion mit His-CRY2 (P+) im Co-IP Ansatz unter Weißlicht stärker war, als das detektierte Signal in der Pelletfraktion mit His-CRY2 im Co-IP Ansatz unter Rotlicht, scheint die Affinität von CIB1 zu lichtangeregtem CRY2 höher zu sein, als zu CRY2 im nicht angeregten Zustand. In dieser Analyse konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Rotlichtprobe auch aktives CRY2 vorlag. Die beobachtete geringere Signalstärke von CIB1 in der Pelletfraktion mit His-CRY2 könnte somit auch auf einer Interaktion mit noch teilweise vorliegendem angeregtem CRY2 beruhen. Für die Co-IP Ansätze mit PIF3 als *prey*-Protein konnte kein klarer Unterschied zwischen den beiden Ansätzen im Weißlicht bzw. Rotlicht beobachtet werden (Abb. 4.10 E). PIF3 konnte nach der Co-IP mit His-CRY2 sowohl im Weißlicht wie auch im Rotlicht Ansatz detektiert, was auf eine Interaktion der beiden Proteine schließen lässt. Jedoch wurde PIF3 auch in den Pellet Fraktionen beider Ansätze ohne His-CRY2 detektiert, doch mit unterschiedlicher Signalintensität. Das zeigt, dass Weißlicht den Signalzustand von CRY2

per se beeinflusst, und dass CRY2 nach Weißlichtbestrahlung in den Signalzustand überführt wurde. Im Weißlicht Ansatz ist die Signalintensität von PIF3 in der Pelletfraktion mit His-CRY2 (P+) höher, als in der Pelletfraktion ohne His-CRY2 (P-). Im Gegensatz dazu ist die Signalstärke von PIF3 in beiden Pelletfraktionen des Rotlicht Ansatzes ähnlich. Dies spricht für eine gesteigerte Affinität von PIF3 zu angeregtem CRY2. Eine direkte Regulierung des bHLH Transkriptionsfaktors PIF3 über CRY2 nach Blaulicht Eingang wäre somit denkbar. Dadurch könnte CRY2 indirekt die Aktivierung bestimmter Gene für die Entwicklung im Licht steuern. Zusätzlich wäre auch eine gemeinsame Regulation von PIF3 über CRY2 und phyA denkbar, was auch den Einfluss von phyA auf die Stabilität von CRY2 beeinflussen könnte. Denkbar wäre, dass bei Abwesenheit von phyA wesentlich mehr CRY2 an PIF3 bindet und somit für andere Interaktionspartner wie COP1 eine geringere Affinität aufweist, was dann zu verminderten Abbau führt.

Um die beobachtete spezifische Interaktion der verschiedenen untersuchten *prey*-Proteine in Abhängigkeit von der Anwesenheit von CRY2 zu untermauern wurde His-EcPHR in Co-IP-Studien als Negativkontrolle verwendet. Die *E. coli* DNA Photolyase (EcPHR) weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Cryptochrom 1 auf (Brautigam *et al.*, 2004), und somit vermutlich auch zu Cryptochrome 2. Wie oben bereits erwähnt, wurde die Anwesenheit des Chromophors FAD spektroskopisch überprüft (Abb. 4.11 A) und sichergestellt, dass die eingesetzte rekombinante Photolyase His-EcPHR in der Lage ist, einen Photozyklus zu durchlaufen und somit biologisch aktiv war. Keines der getesteten *prey*-Proteine COP1, CIB1 und SPA1, die mit His-CRY2 in den vorangegangenen Co-IP Studien interagierten, zeigte eine spezifische Interaktion im Weißlicht mit der His-EcPHR, die in gleicher Proteinkonzentration wie His-CRY2 verwendet wurde (Abb. 4.10 E).

Die hier postulierte direkte Interaktion von SPA1 und SPA4 mit Cryptochrom 2 wird durch den oben bereits beschriebenen Einfluss beider Proteine in der blaulichtabhängigen Degradation im niedrigen, bzw. hohen Fluenzratenbereich unterstützt (siehe 5.1). Ein mögliches Modell wäre, dass die Degradation von CRY2, die im Nukleus durch Protein-Komplexe gesteuert wird (Yu *et al.*, 2009), über SPA1, SPA4 und COP1 als Bestandteile dieses Komplexes reguliert wird. Ob anhand dieser Daten eine Rolle für PIF3 möglicherweise in einem CRY2-Signalweg zusammen mit CIB1 postuliert werden kann, ist fraglich und bleibt Grundlage weiterer Untersuchungen.

### 5.3 Blaulicht abhängige Phosphorylierung von Cryptochrom 2

Die Phosphorylierung von Proteinen ist in vielen Signaltransduktionswegen essentiell für die Signalweiterleitung und oft auch Voraussetzung für die Degradation über eine Poly-

ubiquitinierung der Proteine mit anschließendem proteasomalem Abbau über das 26S Proteasom. Die Phosphorylierung der Cryptochrome 1 und 2 von *Arabidopsis thaliana* war Gegenstand mehrerer Untersuchungen und ist in der Literatur ausführlich beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass CRY1 ein Substrat für die Phosphorylierung durch die Kinaseaktivität von phyA ist (Ahmad *et al.*, 1998). Für CRY2 konnte eine blaulichtabhängige Phosphorylierung *in vivo* nachgewiesen werden, die nicht in Rotlicht bzw. Dunkelrotlicht beobachtet werden konnte (Shalitin *et al.*, 2002). In transgenen *Arabidopsis thaliana* Keimlingen wurde eine lichtunabhängige, konstitutive Phosphorylierung von GUS:CCT2 beobachtet (Yang *et al.*, 2000; Shalitin *et al.* 2002). Die Korrelation zwischen einer konstitutiven Phosphorylierung einerseits und einhergehender konstitutiver Aktivität des Cryptochrom C-Terminus (CCT) andererseits wurde als Nachweis angesehen, dass die Phosphorylierung notwendig ist für die Signalweiterleitung. Des Weiteren ist die phosphorylierte Form der Cryptochrome wahrscheinlich auch ein Substrat für die COP1 vermittelte proteasomale Degradation von CRY2. So wird phosphoryliertes CRY2 in *cop1*-defizienten Mutanten langsamer abgebaut als im Wildtyp (Shalitin *et al.*, 2002). Für CRY1 wurde gezeigt, dass eine blaulichtabhängige Phosphorylierung auch in verschiedenen Phytochrom-defizienten Mutanten stattfindet (Shalitin *et al.*, 2002, 2003). Verschiedene *cry1*-Mutanten, die unter Blaulicht ein verlängertes Hypokotyl zeigten und somit in der Signalweiterleitung beeinträchtigt waren, wurden untersucht und wiesen alle eine fehlende Phosphorylierung auf. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem Model, dass eine Phosphorylierung notwendig ist für ihre Signalweiterleitung. Obwohl beide Cryptochrome keine Kinase-ähnliche Domäne besitzen, zeigte isoliertes CRY1 aus Insektenzellen eine blaulichtabhängige Phosphorylierung, so dass auch eine Autophosphorylierung der Cryptochrome möglich ist (Bouly *et al.*, 2003; Shalitin *et al.*, 2003). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass CRY1 aus *Arabidopsis thaliana* und vom Menschen an eine ATP-Affinitätsmatrix binden kann (Bouly *et al.*, 2003) und zusätzlich nicht hydrolysierbare ATP-Derivate in kristallographischen Analysen in *Arabidopsis thaliana* CRY1 nachgewiesen werden konnten (Brautigam *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Phosphorylierung von CRY2 ebenfalls untersucht werden. Bei immunologischen Analysen von Extrakten aus Keimlingen, die konstantem Blaulicht ausgesetzt wurden, konnte die Detektion eines spezifischen Doppelsignals von CRY2 beobachtet werden (Abb. 4.25 A). Bei der Blaulichtbelichtung von Wildtyp (Col-0) *Arabidopsis thaliana* Keimlingen mit einer konstanten Fluenzrate ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) über einen Zeitraum von 2 h konnte die schnelle Abnahme des höher laufenden Signals von CRY2 nach der Blaulichtbestrahlung beobachtet werden, während das untere, tiefer laufende CRY2 Signal, nicht abnahm. Die Detektion einer zweifachen Bande ist spezifisch für CRY2, da im Vergleich zu einem Proteinextrakt aus einer *cry2*-Mutante keines der beiden Signale

detektiert werden konnte. Aufgrund oben beschriebener Daten aus der Literatur, wurde daher angenommen, dass das detektierte Doppelsignal einem Phosphorylierungs-„*shift*“ von CRY2 entsprechen könnte. Dieser besteht aus einem höher laufenden Signal von phosphoryliertem CRY2, das dem phosphoryliertem CRY2 entsprechen könnte welches nach erfolgter Blaulichtbelichtung schnell abgebaut wird. Wohingegen das tiefer laufende Signal dem unphosphorylierten CRY2 entsprechen könnte. Die Untersuchung dieses Doppelsignales mit einem immunologischen Nachweis von CRY2 aus Extrakten der Dreifachmutante *spa1/2/4* zeigte, dass die Intensität des detektierten höheren CRY2 Signals in der Mutante über die Zeit langsamer abnahm, verglichen mit dem höher laufenden phosphorylierten CRY2-Signal im Col-0 Wildtyp. Aufgrund dieser Daten wurde einerseits versucht, den aus der Literatur bekannten Nachweis der blaulichtabhängigen Phosphorylierung zu reproduzieren und andererseits sollte untersucht werden, inwieweit die Proteine COP1, SPA und/oder phyA für die Phosphorylierung von CRY2 notwendig sind. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der Grad der Phosphorylierung mit der eingesetzten Blaulichtfluenzrate korrelierte. Dazu wurden Extrakte von *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge der oben aufgezählten Genotypen nach unterschiedlicher Blaulichtbehandlung unter Sicherheitslicht mit oder ohne  $\lambda$ -Phosphatase behandelt. Parallel wurde in einem dritten Ansatz  $\lambda$ -Phosphatase und dessen Inhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zugesetzt. Dabei orientierten sich die Experimente an den bereits oben beschriebenen Analysen aus der Literatur (Shalitin *et al.*, 2003 und 2003). Die immunologische Analyse dieser Ansätze (Abb. 4.25 B und C) zeigte jedoch keine Abnahme des höher laufenden CRY2 Signals unabhängig von Zugabe der  $\lambda$ -Phosphatase. Die Detektion des Doppelsignals von CRY2 entsprach somit in dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht einem phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Zustand von CRY2. Überraschenderweise konnte kein Unterschied in der Signalintensität der höher laufenden von CRY2 Bande zwischen den Proben mit (+) und ohne (-)  $\lambda$ -Phosphatase beobachtet werden. Auch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Signalintensitäten der einzelnen Mutanten sowie dem Wildtyp festgestellt. Des Weiteren hatten die getesteten unterschiedlichen Blaulichtintensitäten ( $0.1$  und  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) keine Auswirkung auf die detektierte Signalstärke des höher laufenden CRY2 Signals. Jedoch hatte die untere CRY2 Bande eine deutlich geringere Signalintensität im hohen Fluenzratenbereich verglichen zu den Intensitäten der Dunkelprobe bzw. des Ansatzes im niedrigen Fluenzratenbereich ( $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) unabhängig von der vorherigen Behandlung. Da die Aktivität der eingesetzten  $\lambda$ -Phosphatase vorher überprüft worden war, muss davon ausgegangen werden, dass das detektierte Doppelsignal von CRY2 nicht auf unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen von CRY2 zurückzuführen ist. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann somit keine Aussage über den Einfluss der SPA-Proteine, von phyA oder COP1 auf die Phosphorylierung von CRY2 gemacht werden, obwohl zumindest



für COP1 ein Einfluss auf die Menge an phosphoryliertem CRY2 beschrieben wurde (Shalitin *et al.*, 2002). Der Einfluss der Fluenzraten auf den Grad der Phosphorylierung von CRY2 konnte daher ebenfalls anhand der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht bestimmt werden.

#### **5.4 Versuch der Expression von rekombinantem COP1 und dem C-Terminus von Cryptochrom 2 in *E. coli***

Die Herstellung von rekombinanten pflanzlichen volllängen Cryptochromen war lange Zeit schwierig, da ihre Expression in *E. coli* oder Hefe meistens in aggregierten, unlöslichen Proteinfractionen resultierte. Zahlreiche weitere Versuche, *Arabidopsis thaliana* CRY1 und CRY2 unter unterschiedlichen Bedingungen in *E. coli* oder in Hefe zu produzieren waren nicht erfolgreich. Somit gestalten sich die Kristallisation von pflanzlichen Cryptochromen als Volllängenproteine und auch biochemische, bzw. spektroskopische Analysen als schwierig. Der N-Terminus von CRY1 konnte jedoch in *E. coli* löslich exprimiert werden und die nachfolgende Kristallisationsstudien zeigten eine hohe, strukturelle Ähnlichkeit zu der *E. coli* DNA Photolyasen (Brautigam *et al.*, 2004). Ein weiteres Cryptochrom aus *Arabidopsis thaliana*, das CRY3 (CryDASH), welches im Gegensatz zu CRY1 und CRY2 keine C-terminale Extension besitzt, konnte ebenfalls in *E. coli* exprimiert und anschließend seine Kristallstruktur gelöst werden (Huang *et al.*, 2006; Klar *et al.*, 2007; Pokorny *et al.*, 2005). Weitere Expressionsversuche von volllängen *At*-CRY2 als GST-Fusion in Hefe (Sang *et al.*, 2005), bzw. mit einem 6xHis-Tag aus Sf21 Insektenzellen (Özgür und Sancar 2006, Banerjee *et al.*, 2007) lieferten erstmals ausreichende Mengen an löslichen, Chromophorhaltigem Photorezeptor, um entsprechende biochemische und spektroskopische Analysen zu ermöglichen. Dabei konnten Aspekte wie die für die biologische Aktivität notwendige Dimerisierung der Cryptochrome und der Photozyklus des FAD Kofaktors untersucht bzw. aufgeklärt werden (siehe Einleitung 1.3.3.1). Die Strukturen von Cryptochrom 2 als Volllängenprotein, bzw. von verkürzten Proteinen, bestehend nur aus der N- oder C-terminalen Domäne von CRY2 konnten aber trotz der Möglichkeit der rekombinanten Expression des Photorezeptors in löslicher Form bisher noch nicht kristallographisch aufgeklärt werden. Aufgrund der flexiblen und gegenüber proteolytischem Abbau sensitiven C-terminalen Domäne von Cryptochrom 2 gestaltet sich dieses für das volllängen Protein immer noch schwierig.

Der C-Terminus der Cryptochrome (CCT) gilt als die signalweiterleitende Domäne, die im Dunkeln von der N-terminalen Photolyase-ähnlichen Domäne reprimiert wird. Die essentielle Bedeutung der CCT-Domäne für die biologische Funktion des Photorezeptors ist aus der Literatur bekannt (Einleitung 1.3.3.1)

Im Rahmen dieser Arbeit sollten aufgrund vorangegangener Versuche (Diplomarbeit Guido Weidler, 2007) die Expression des rekombinanten Fusions-Konstruktes Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2, sowie die Expression verschiedener rekombinanter COP1-Konstrukte weiterverfolgt und optimiert werden. Ziel war es bei Vorliegen der rekombinanten Proteine in ausreichender löslicher und gereinigter Form, *in vitro* Homodimerisierungs-Experimente von CCT2 und Interaktionsstudien von CCT2 mit COP1 über Co-Immunopräzipitations-Ansätze durchzuführen, sowie nachfolgende Co-Kristallisations-Studien von CCT2 und COP1 zu ermöglichen. Der Interaktionspartner COP1 sollte dabei stabilisierend auf die flexible CCT2-Domäne während des Kristallisationsprozesses wirken.

In vorangegangenen Versuchen traten bereits erhebliche Schwierigkeiten bei der Expression von COP1 auf, betreffend der erzielbaren Proteinmenge und der Reinheit des rekombinanten Proteins nach dessen Aufreinigung. Daher wurden neben dem volllängen COP1 Konstrukt verschiedene große C-terminale Fragmente von COP1 hergestellt und versucht, diese löslich zu exprimieren. Hierfür wurden verschiedene *E. coli* Stämme, Expressions-Vektoren sowie Expressionsbedingungen getestet (siehe Abb. 4.1, Tabelle 4.1 und Anhang A2 A und B). Wie im Ergebnisteil 4.1 dargestellt, konnte das angestrebte Ziel, ausreichende Mengen an rekombinantem COP1 zu generieren, nicht verwirklicht werden. Zwar zeigten einige hergestellte und auf ihre Expression und Reinigung hin untersuchte Konstrukte, insbesondere die auf die C-terminale Domäne von COP1 beschränkten Varianten wie CCOP1 (Abb. 4.2) sowie HBG (Abb. 4.5), vielversprechende Resultate in den Expressionsanalysen. Jedoch waren die erzielbaren Mengen ( $\mu\text{g}$ ) und der Grad der Reinheit der erzielten Proteine nach der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie nicht ausreichend für weiterfolgende Untersuchungen, wie z.B. die angedachten Kristallisationsstudien zur Strukturaufklärung eines CCT2-COP1-Komplexes, die in Kooperation mit strukturellen Arbeitsgruppen erfolgen sollten.

Da die Strukturaufklärung des C-Terminus von Cryptochrom 2 im Vordergrund stand, wurde auch die Optimierung der Expression des rekombinanten Fusions-Konstruktes Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 weiterverfolgt. Dies geschah einerseits, um die oben bereits erwähnte Co-Kristallisation mit COP1 durchzuführen, andererseits um die Interaktion mit COP1 *in vitro* durch *pull-down*-Experimente und Affinitätsreinigung des Protein-Komplexes im Hinblick auf die Notwendigkeit der Dimerisierung von CCT2 auf die Interaktion mit Signaltransduktions-Faktoren wie COP1 zu studieren. Hierbei konnte zwar die Expression hinsichtlich der Menge optimiert werden, jedoch führte die ineffiziente Bindung des rekombinanten Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2-Proteins an die Affinitätsmatrix *StrepTactin* jeweils im *Batch*-Maßstab oder mit Hilfe des ÄKTA-Purifiers zu Verlusten an Protein während des Aufreinigungsprozesses (Abb. 4.7 und 4.8). Des Weiteren zeigten Gelfiltrationsanalysen (Anhang A3), die zur Steigerung des Reinheitsgrades des rekombinanten Proteins nach der chromatographischen Aufreinigung

durchgeführt wurden, dass das rekombinante Fusionsprotein unter diesen Bedingungen oligomerisiert vorlag. Dieses Ergebnis könnte die Verluste während der Proteinreinigung erklären, da das Bindungsverhalten des Proteins an die Matrix durch die Oligomerisierung beeinflusst wird. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass das Konstrukt für die angedachten Dimerisierungs-Experimente aufgrund der bereits vorliegenden Oligomerisierung des rekombinanten Fusionsproteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 ungeeignet ist. Trotz der nicht erreichten Expressionsziele im Hinblick auf Menge und Reinheit der rekombinanten Proteine wurden anschließend Co-IP Analysen durchgeführt, um die Interaktion zwischen COP1 und CCT2 *in vitro* biochemisch nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse führten jedoch zu keiner klaren Aussage. Daher wurde für COP1 anschließend das TNT-System zur *in vitro*-Expression genutzt und für CRY2 fand die bereits in Banerjee *et al.* (2007) etablierte Insektenzell-Expression Verwendung, um die Interaktion der beiden Proteine *in vitro* zu untersuchen (Abb. 4.11).

## 6. Zusammenfassung

Cryptochrome (CRY) sind UV-A/Blaulicht Photorezeptoren, die in allen Organismenreichen vorkommen und eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu DNA-Photolyasen haben. Sie tragen die gleichen Kofaktoren wie DNA-Photolyasen, zeigen aber mit Ausnahme der cryDASH-Familie keine DNA-Reparaturaktivität. Cryptochrome nutzen stattdessen das Lichtsignal, um in Pflanzen deren Entwicklung zu steuern. Cryptochrom 1 (CRY1) und 2 (CRY2) aus *Arabidopsis thaliana* vermitteln nach Absorption des Lichtsignals über die in ihrer N-terminalen PHR (*photolyase related*) Domäne gebundenen Chromophore die Signalweiterleitung über ihre C-terminale Extension an *downstream* Interaktionspartner. Eine lichtabhängige Phosphorylierung sowie Dimerisierung scheint für beide Cryptochrome für die Signaltransduktion und ihre biologische Funktion essentiell zu sein. Während CRY1 lichtstabil ist, wird CRY2 nach Blaulichtbelichtung schnell abgebaut. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von *Arabidopsis* CRY2. Insbesondere die Prozesse der Dimerisierung, der Phosphorylierung und des lichtgesteuerten Abbaus wurden näher untersucht.

Cryptochrom 2 interagiert über seinen C-Terminus (CCT2) mit der C-terminalen WD-40 Domäne von COP1, einer E3-Ligase, die als Repressor der Photomorphogenese in Pflanzen fungiert. Des Weiteren haben unter anderem Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass nur die dimere Form von CCT2 biologisch aktiv ist. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, CCT2 als Fusion mit dem Rapalog-induzierbaren FKBP<sub>(v)</sub>-Protein, sowie COP1 als Vollängen- oder verkürztes Protein, welches nur aus der C-terminalen Domäne besteht, in *E. coli* löslich zu exprimieren und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Mit Hilfe dieser Proteine sollte geklärt werden, ob nur die dimere Form von CCT2 mit COP1 interagiert. Hierfür waren Co-Immunopräzipitationsanalysen (Co-IP) geplant. Weiterhin sollten die gereinigten Proteine für Kokristallisationsexperimente eingesetzt werden.

Die Ausbeuten an löslichem COP1, bzw. verkürzter COP1 Proteine waren gering und Versuche der Optimierung der Expression gelangen nicht. Des Weiteren zeigte sich, dass das CCT2-Fusionsprotein nach Expression in *E. coli* und nachfolgender Aufreinigung und Ankonzentrierung Oligomere bereits ohne Zugabe des chemischen *Inducer* bildet. Dennoch wurden Co-IPs durchgeführt, die aber keine Aussage darüber ermöglichten, ob CCT2 als Dimer für die Interaktion mit COP1 vorliegen muss. Aufgrund der vorgenannten Probleme war eine Kokristallisation von CCT2 mit COP1 nicht möglich.

Die blaulichtabhängige Phosphorylierung und der Abbau von CRY2 *in vivo* wurde durch immunologische Analysen untersucht. Insbesondere wurde hierbei der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Mitglieder der SPA-Proteinfamilie auf die Phosphorylierung und den Abbau von CRY2 haben. Die vier in *Arabidopsis* vorhandenen SPA Proteine fungieren zusammen

mit COP1 ebenfalls als Repressoren der Photomorphogenese. Zur Beantwortung der Frage, ob SPA-Proteine am Abbau von CRY2 beteiligt sind, wurden CRY2 Gehalte in zahlreichen *spa* Mutanten untersucht. Weiterhin wurde eine mögliche Interaktion von SPA Proteinen mit CRY2 *in vitro* überprüft. Es konnte hierbei ein Einfluss der SPA Proteine auf die Stabilität von CRY2 im Blaulicht gezeigt werden, insbesondere unter niedrigen Fluenzraten. In Co-IP Analysen wurde eine direkte Interaktion von CRY2 mit SPA1 und SPA4 gezeigt. Zusammengefasst zeigen die erzielten Ergebnisse, dass SPA-Proteine am Abbau von CRY2 beteiligt sind und hierfür vermutlich eine direkte Interaktion von CRY2 mit SPA1 und SPA4 erforderlich ist.

Weitere Analysen von CRY2 Proteinleveln in *phyA* Mutanten zeigten einen bis dahin unbekannten Einfluss von Phytochrom A auf die Stabilität von CRY2. Konsistent mit der Rolle der SPA-Proteine im Signalweg von *phyA* wiesen die *phyA*-Mutanten im niedrigen Fluenzratenbereich höhere CRY2-Level als der Wildtyp auf. Dieser *phyA* Effekt wurde nur im Blaulicht, nicht aber unter Rot- und Dunkelrotlicht beobachtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass für den Abbau von CRY2 dessen vorherige Aktivierung durch Blaulicht zwingend erforderlich ist. Die Analyse einer *phyB*-Mutante zeigte hingegen keinen Unterschied zum Wildtyp.

Die Untersuchungen zur blaulichtabhängigen Phosphorylierung von CRY2 *in vivo* ergaben zu bereits bekannten Daten aus der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Der in der Literatur beschriebene Effekt auf die Mobilität von CRY2 durch Phosphorylierung bei SDS-Gelelektrophorese wurde zwar auch in der vorliegenden Arbeit durch das Auftreten einer zweiten CRY2 Bande gesehen, allerdings war diese bereits in Dunkelproben vorhanden und durch Behandlung der Extrakte mit  $\lambda$ -Phosphatase unverändert. Der Nachweis einer blaulichtabhängigen Phosphorylierung von CRY2 konnte somit nicht geführt werden. Dennoch wurde eine im Vergleich zum Wildtyp verlangsamte Abnahme der oberen CRY2-Bande in der untersuchten *spa*-Mutante beobachtet. Dennoch erlauben die bislang vorliegenden Ergebnisse keine Aussage darüber, ob der Phosphorylierungszustand von CRY2 durch SPA beeinflusst wird.

Ein weitere Befund der vorliegenden Arbeit sind Unterschiede im Abbau von *cry2* in verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis*. Der Abbau von CRY2 war zwar in den drei untersuchten Ökotypen *Columbia* (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und *Reshew* (RLD) durch das Proteasom vermittelt, jedoch war in Col-0 im niedrigen Fluenzratenbereich weniger CRY2 vorhanden als in den anderen Ökotypen. Diese höhere Sensitivität für Blaulicht von Col-0 zeigte sich aber nicht in anderen Photoantworten wie der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M., and Cashmore, A.R.** (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Ahmad, M., Lin, C., and Cashmore, A.R.** (1995). Mutations throughout an Arabidopsis blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J* **8**, 653-658.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., and Cashmore, A.R.** (1998). Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* **10**, 197-207.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., and Kay, S.A.** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* **293**, 880-883.
- Ang, L.H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., and Deng, X.W.** (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell* **1**, 213-222.
- Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, A.P., and Brettel, K.** (2000). Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**, 586-590.
- Baer, M., and Sancar, G.B.** (1989). Photolyases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* recognize common binding determinants in DNA containing pyrimidine dimers. *Mol Cell Biol* **9**, 4777-4788.
- Bagnall, D.J., King, R.W., and Hangarter, R.P.** (1996). Blue-light promotion of flowering is absent in hy4 mutants of Arabidopsis. *Planta* **200**, 278-280.
- Banerjee, R., and Batschauer, A.** (2005). Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498-502.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Viana, R.M., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R., and Batschauer, A.** (2007). The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J Biol Chem* **282**, 14916-14922.
- Batschauer, A.** (1993). A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J* **4**, 705-709.
- Batschauer, A.** (2003). Photoreceptors and Light Signalling. Cambridge, UK.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., and Braus, G.H.** (2008). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* **19**, 3254-3262.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bognar, L.K., Hall, A., Adam, E., Thain, S.C., Nagy, F., and Millar, A.J.** (1999). The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14652-14657.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H., and Toole, V.K.** (1952). A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**, 662-666.
- Bouly, J.P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E.A., Batschauer, A., and Ahmad, M.** (2003). Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with Arabidopsis and human cryptochrome-1. *Eur J Biochem* **270**, 2921-2928.
- Bouly, J.P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R., and Ahmad, M.** (2007). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem* **282**, 9383-9391.
- Brautigam, C.A., Smith, B.S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D.R., Machius, M., and Deisenhofer, J.** (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12142-12147.
- Briggs, W.R., and Rice, H.V.** (1972). Phytochrome: Chemical and Physical Properties and Mechanism of Action. *Annu Rev Plant Physiol* **23**, 293-334.

- Briggs, W.R., and Olney, M.A.** (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* **125** (1), 85-88.
- Briggs, W.R., and Christie, J.M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.
- Briggs, W.R., and Spudich, J.L.** (2005). *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VHC Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A., and Getzoff, E.D.** (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* **11**, 59-67.
- Brunelle S.A., Starr Hazard E, Sotka EE, and Van Dolah FM.** (2007). Characterization of a dinoflagellate Cryptochrome blue-light receptor with a possible role in a circadian control of the cell cycle. *J Phycol* **42**, 509-518.
- Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E.A., Ahmad, M., and Bouly, J.P.** (2009). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *FEBS Lett* **583**, 1427-1433.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., and Hendricks, S.B.** (1959). Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1703-1708.
- Byrdin, M., Eker, A.P., Vos, M.H., and Brettel, K.** (2003). Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in Escherichia coli DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8676-8681.
- Canamero, R.C., Bakrim, N., Bouly, J.P., Garay, A., Dudkin, E.E., Habricot, Y., and Ahmad, M.** (2006). Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in Arabidopsis thaliana. *Planta* **224**, 995-1003.
- Casal, J.J., and Boccacandro, H.** (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in Arabidopsis thaliana. *Planta* **197**, 213-218.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., and Liu, D.** (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.
- Cashmore, A.R.** (2003). Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* **114**, 537-543.
- Castillon, A., Shen, H., and Huq, E.** (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**, 514-521.
- Chen, M., Chory, J., and Fankhauser, C.** (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**, 87-117.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.R., and Song, P.S.** (1999). Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* **401**, 610-613.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., and Briggs, W.R.** (1998). Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Christie, J.M., Swartz, T.E., Bogomolni, R.A., and Briggs, W.R.** (2002). Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* **32**, 205-219.
- Christie, J.M.** (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-45.
- Christine, K.S., MacFarlane, A.W.t., Yang, K., and Stanley, R.J.** (2002). Cyclobutylpyrimidine dimer base flipping by DNA photolyase. *J Biol Chem* **277**, 38339-38344.
- Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R.A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**, 413-427.
- Clough, R.C., and Viestra, R.D.** (1997). Phytochrom degradation. *Plant Cell Environ.* **20**, 713-721.

- Clough, R.C., Jordan-Beebe, E.T., Lohman, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M., Gatz, C., and Vierstra, R.D. (1999). Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J* **17**, 155-167.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., and Somerville, C.R. (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3718-3723.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T., and Toh, H. (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells* **9**, 479-495.
- Darwin, C. (1880). *The Power of movements in Plants*. Da Capo Press Reprint Ed, New York.
- Dehesh, K., Franci, C., Parks, B.M., Seeley, K.A., Short, T.W., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1993). *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**, 1081-1088.
- Deng, X.W., Caspar, T., and Quail, P.H. (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **5**, 1172-1182.
- Devlin, P.F., and Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**, 2499-2510.
- Duek, P.D., and Fankhauser, C. (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J* **34**, 827-836.
- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R., and Fankhauser, C. (2004). The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol* **14**, 2296-2301.
- Eichenberg, K., Baurle, I., Paulo, N., Sharrock, R.A., Rudiger, W., and Schafer, E. (2000). *Arabidopsis* phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Lett* **470**, 107-112.
- Eker, A.P., Kooiman, P., Hessels, J.K., and Yasui, A. (1990). DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem* **265**, 8009-8015.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V., and Koornneef, M. (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet* **29**, 435-440.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Wagemaker, C., Weller, J.L., and Koornneef, M. (2003). The role of cryptochrome 2 in flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**, 1504-1516.
- Exner, V., Alexandre, C.M., Rosenfeldt, G., Alfrano, P., Nater, M., Caflish, A., Gruissem, W., Batschauer, A., and Hennig, L. (2010). A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1 promotes flowering. *Plant Physiol*.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D., and Chory, J. (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539-1541.
- Fankhauser, C., and Staiger, D. (2002). Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*, light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216** (1), 1-16.
- Fittinghoff, K., Laubinger, S., Nixdorf, M., Fackendahl, P., Baumgardt, R.L., Batschauer, A., and Hoecker, U. (2006). Functional and expression analysis of *Arabidopsis* SPA genes during seedling photomorphogenesis and adult growth. *Plant J* **47**, 577-590.
- Folta, K.M., and Spalding, E.P. (2001). Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* **26**, 471-478.
- Folta, K.M., Pontin, M.A., Karlin-Neumann, G., Bottini, R., and Spalding, E.P. (2003). Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *Plant J* **36**, 203-214.
- Folta, K.M., and Maruhnich, S.A. (2007). Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot* **58**, 3099-3111.
- Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**, 11-24.



- Froehlich, A.C., Chen, C.H., Belden, W.J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., Loros, J.J., and Dunlap, J.C.** (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **9**, 738-750.
- Fujihashi, M., Numoto, N., Kobayashi, Y., Mizushima, A., Tsujimura, M., Nakamura, A., Kawarabayashi, Y., and Miki, K.** (2007). Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *J Mol Biol* **365**, 903-910.
- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., and Mizuno, T.** (2004). Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**, 1078-1086.
- Gallagher, S., Short, T.W., Ray, P.M., Pratt, L.H., and Briggs, W.R.** (1988). Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8003-8007.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., and Brettel, K.** (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Biol* **10**, 489-490.
- Gressel, J.** (1977). Blue Light photoreception. *Photochem Photobiol* **30**, 49-754.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., and Lin, C.** (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**, 1360-1363.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., and Lin, C.** (1999). The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J* **19**, 279-287.
- Guo, H., Mockler, T., Duong, H., and Lin, C.** (2001). SUB1, an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **291**, 487-490.
- Gyula, P., Schaefer, E., and Nagy, F.** (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **6** (5), 446-452.
- Hamazato, F., Shinomura, T., Hanzawa, H., Chory, J., and Furuya, M.** (1997). Fluence and wavelength requirements for *Arabidopsis* CAB gene induction by different phytochromes. *Plant Physiol* **115**, 1533-1540.
- Hamm-Alvarez, S., Sancar, A., and Rajagopalan, K.V.** (1989). Role of enzyme-bound 5,10-methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *J Biol Chem* **264**, 9649-9656.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harada, A., Sakai, T., and Okada, K.** (2003). Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8583-8588.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K., and Deng, X.W.** (2000). HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* **19**, 4997-5006.
- Hardtke, C.S., Okamoto, H., Stoop-Myer, C., and Deng, X.W.** (2002). Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the *Arabidopsis* COP1 interacting protein 8 (CIP8). *Plant J* **30**, 385-394.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-2113.
- Harper, S.M., Neil, L.C., and Gardner, K.H.** (2003). Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**, 1541-1544.
- Hayama, R., and Coupland, G.** (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **135**, 677-684.
- Heelis, P.F., and Sancar, A.** (1986). Photochemical properties of *Escherichia coli* DNA photolyase: a flash photolysis study. *Biochemistry* **25**, 8163-8166.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., and Schafer, E.** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **128**, 194-200.

- Hershey, H.P., Colbert, J.T., Lissemore, J.L., Barker, R.F., and Quail, P.H.** (1984). Molecular cloning of cDNA for *Avena* phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2332-2336.
- Hisada, A., Hanzawa, H., Weller, J.L., Nagatani, A., Reid, J.B., and Furuya, M.** (2000). Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *Plant Cell* **12**, 1063-1078.
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M., and Todo, T.** (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res* **28**, 2353-2362.
- Hoang, N., Schleicher, E., Kacprzak, S., Bouly, J.P., Picot, M., Wu, W., Berndt, A., Wolf, E., Bittl, R., and Ahmad, M.** (2008). Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biol* **6**, e160.
- Hoecker, U., Xu, Y., and Quail, P.H.** (1998). SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**, 19-33.
- Hoecker, U., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). SPA1, a WD-Repeat Protein Specific to Phytochrome A Signal Transduction. *Science* **284**, 496-499.
- Hoecker, U., and Quail, P.H.** (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**, 38173-38178.
- Hoecker, U.** (2005). Regulated proteolysis in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 469-476.
- Hoffman, P., Batschauer, A., and Hays, J.** (1996). PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet* **253**, 259-265.
- Holm, M., and Deng, X.W.** (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated development switch. *Plant Mol. Biology* **41**, 151-158.
- Holm, M., Hardtke, C.S., Gaudet, R., and Deng, X.W.** (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J* **20**, 118-127.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W.** (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **16**, 1247-1259.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R.** (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Huang, Y., Baxter, R., Smith, B.S., Partch, C.L., Colbert, C.L., and Deisenhofer, J.** (2006). Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17701-17706.
- Huq, E., and Quail, P.H.** (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* **21**, 2441-2450.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., and Quail, P.H.** (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **305**, 1937-1941.
- Imaizumi, T., Kanegae, T., and Wada, M.** (2000). Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell* **12**, 81-96.
- Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M., and Wada, M.** (2002). Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **14**, 373-386.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., and Kay, S.A.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 302-306.
- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., and Kay, S.A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 293-297.
- Imaizumi, T.** (2010). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 83-89.

- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K., and Sakai, T.** (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 887-896.
- Jackson, J.A., Fuglevand, G., Brown, B.A., Shaw, M.J., and Jenkins, G.I.** (1995). Isolation of *Arabidopsis* mutants altered in the light-regulation of chalcone synthase gene expression using a transgenic screening approach. *Plant J* **8**, 369-380.
- Jang, I.C., Yang, J.Y., Seo, H.S., and Chua, N.H.** (2005). HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev* **19**, 593-602.
- Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R.** (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954.
- Jenkins, G.I.** (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 407-431.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**, 217-230.
- Johnson, J.L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G.B., Rajagopalan, K.V., and Sancar, A.** (1988). Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2046-2050.
- Jorns, M.S., Sancar, G.B., and Sancar, A.** (1984). Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* **23**, 2673-2679.
- Kagawa, T.** (2003). The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *J Plant Res* **116**, 77-82.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C.** (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**, 29-66.
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., and Todo, T.** (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol* **45**, 535-548.
- Kanegae, T., and Wada, M.** (1998). Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Mol Gen Genet* **259**, 345-353.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., and Wada, M.** (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829-832.
- Kavakli, I.H., and Sancar, A.** (2004). Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry* **43**, 15103-15110.
- Kehoe, D.M., and Grossman, A.R.** (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-1412.
- Kendrick, R.E., and G.H.M., K.** (1994). *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht; Boston, Kluwer Academic.
- Kevei, E., and Nagy, F.** (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Plant* **117**, 305-313.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., and Quail, P.H.** (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**, 3033-3044.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., and Song, P.S.** (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* **15**, 2399-2407.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., and Somers, D.E.** (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356-360.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K.** (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660.

- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., and Nagy, F.** (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**, 1445-1456.
- Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A., and Essen, L.O.** (2007). Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J Mol Biol* **366**, 954-964.
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A.** (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* **35**, 93-103.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., and Batschauer, A.** (1999). Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J* **19**, 289-296.
- Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y., and Miki, K.** (2001). Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13560-13565.
- Koornneef, M., Rolff, E., and Spruitt, C.J.P.** (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Z. Pflanzenphysiol* **100**, 147-160.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **229**, 57-66.
- Kottke, T., Batschauer, A., Ahmad, M., and Heberle, J.** (2006). Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 2472-2479.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagarias, J.C., and Mercurio, F.M.** (1985). Structure function studies on phytochrome. Identification of light-induced conformational changes in 124-kDa *Avena* phytochrome in vitro. *J Biol Chem* **260**, 2415-2423.
- Lariguet, P., and Fankhauser, C.** (2004). Hypocotyl growth orientation in blue light is determined by phytochrome A inhibition of gravitropism and phototropin promotion of phototropism. *Plant J* **40**, 826-834.
- Laubinger, S., and Hoecker, U.** (2003). The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *Plant J* **35**, 373-385.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K., and Hoecker, U.** (2004). The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2293-2306.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Quail, P.H.** (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**, 337-352.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., and Quail, P.H.** (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* **18**, 1815-1823.
- Li, Y.F., Kim, S.T., and Sancar, A.** (1993). Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4389-4393.
- Liberles, S.D., Diver, S.T., Austin, D.J., and Schreiber, S.L.** (1997). Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7825-7830.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D., and Cashmore, A.R.** (1995). Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8423-8427.
- Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A., Jorns, M.S., Dutton, P.L., and Cashmore, A.R.** (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* **269**, 968-970.
- Lin, C., Ahmad, M., and Cashmore, A.R.** (1996). *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J* **10**, 893-902.

- Lin, C., Ahmad, M., Chan, J., and Cashmore, A.R.** (1996). CRY2: a second member of the Arabidopsis cryptochrome gene family. *Plant Physiol* **110**, 1047.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., and Cashmore, A.R.** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2686-2690.
- Lin, C.** (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl**, S207-225.
- Lin, C., and Shalitin, D.** (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469-496.
- Lin, C., and Todo, T.** (2005). The cryptochromes. *Genome Biol* **6**, 220.
- Lin, R., Ding, L., Casola, C., Ripoll, D.R., Feschotte, C., and Wang, H.** (2007). Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in Arabidopsis. *Science* **318**, 1302-1305.
- Liscum, E., and Briggs, W.R.** (1995). Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**, 473-485.
- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D., and Lin, C.** (2008). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science* **322**, 1535-1539.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., and Deng, X.W.** (2001). Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589-2607.
- Malhotra, K., Kim, S.T., Batschauer, A., Dawut, L., and Sancar, A.** (1995). Putative blue-light photoreceptors from Arabidopsis thaliana and Sinapis alba with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* **34**, 6892-6899.
- Mandel, M., and Higa, A.** (1970). Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. *J Mol Biol* **53**, 159-162.
- Mao, J., Zhang, Y.C., Sang, Y., Li, Q.H., and Yang, H.Q.** (2005). From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12270-12275.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H.** (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.
- Mas, P., Devlin, P.F., Panda, S., and Kay, S.A.** (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**, 207-211.
- Matsui, M., Stoop, C.D., von Arnim, A.G., Wei, N., and Deng, X.W.** (1995). Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4239-4243.
- Matsumoto, N., Hirano, T., Iwasaki, T., and Yamamoto, N.** (2003). Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. *Plant Physiol* **133**, 1494-1503.
- Matsuoka, D., and Tokutomi, S.** (2005). Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13337-13342.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A.** (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**, 571-574.
- Mazzella, M.A., Cerdan, P.D., Staneloni, R.J., and Casal, J.J.** (2001b). Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of Arabidopsis development. *Development* **128**, 2291-2299.
- McNellis, T.W., von Arnim, A.G., Araki, T., Komeda, Y., Misera, S., and Deng, X.W.** (1994). Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* **6**, 487-500.
- McNellis, T.W., von Arnim, A.G., and Deng, X.W.** (1994). Overexpression of Arabidopsis COP1 results in partial suppression of light-mediated development: evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. *Plant Cell* **6**, 1391-1400.

- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A.P., Carell, T., and Essen, L.O.** (2004). Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science* **306**, 1789-1793.
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., and Lin, C.** (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* **126**, 2073-2082.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.C., Dolan, S., and Lin, C.** (2003). Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2140-2145.
- Moldt, J., Pokorny, R., Orth, C., Linne, U., Geisselbrecht, Y., Marahiel, M.A., Essen, L.O., and Batschauer, A.** (2009). Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family. *J Biol Chem* **284**, 21670-21683.
- Moller, A., Sagasser, S., Wiltshko, W., and Schierwater, B.** (2004). Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* **91**, 585-588.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y., and Quail, P.H.** (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16091-16098.
- Muller, M., and Carell, T.** (2009). Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 277-285.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol* **155**, 335-350.
- Nagatani, A., Reed, J.W., and Chory, J.** (1993). Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol.* **102**, 269-277.
- Nagy, F., and Schafer, E.** (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 329-355.
- Neff, M.M., and Van Volkenburgh, E.** (1994). Light-Stimulated Cotyledon Expansion in Arabidopsis Seedlings (The Role of Phytochrome B). *Plant Physiol* **104**, 1027-1032.
- Neff, M.M., and Chory, J.** (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol* **118**, 27-35.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B.** (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *Cell* **101**, 331-340.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**, 781-784.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**, 781-784.
- Ninu, L., Ahmad, M., Miarelli, C., Cashmore, A.R., and Giuliano, G.** (1999). Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant J* **18**, 551-556.
- Nixdorf, M., and Hoecker, U.** SPA1 and DET1 act together to control photomorphogenesis throughout plant development. *Planta* **231**, 825-833.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J.I., Kang, C., and Choi, G.** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**, 3045-3058.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.S., Sun, T.P., Kamiya, Y., and Choi, G.** (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **19**, 1192-1208.

- Ohgishi, M., Saji, K., Okada, K., and Sakai, T.** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2223-2228.
- Osterlund, M.T., Wei, N., and Deng, X.W.** (2000). The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiol* **124**, 1520-1524.
- Ozturk, N., Song, S.H., Selby, C.P., and Sancar, A.** (2008a). Animal type 1 cryptochromes. Analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **283**, 3256-3263.
- Ozturk, N., Kao, Y.T., Selby, C.P., Kavakli, I.H., Partch, C.L., Zhong, D., and Sancar, A.** (2008b). Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry* **47**, 10255-10261.
- Park, H.W., Kim, S.T., Sancar, A., and Deisenhofer, J.** (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* **268**, 1866-1872.
- Park, C.M., Bhoo, S.H., and Song, P.S.** (2000). Inter-domain crosstalk in the phytochrome molecules. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 449-456.
- Parks, B.M., Folta, K.M., and Spalding, E.P.** (2001). Photocontrol of stem growth. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 436-440.
- Partch, C.L., and Sancar, A.** (2005). Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle. *Photochem Photobiol* **81**, 1291-1304.
- Payne, G., Heelis, P.F., Rohrs, B.R., and Sancar, A.** (1987). The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry* **26**, 7121-7127.
- Payne, G., Wills, M., Walsh, C., and Sancar, A.** (1990). Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues. *Biochemistry* **29**, 5706-5711.
- Perrotta, G., Ninu, L., Flamma, F., Weller, J.L., Kendrick, R.E., Nebuloso, E., and Giuliano, G.** (2000). Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2. *Plant Mol Biol* **42**, 765-773.
- Perrotta, G., Yahoubyan, G., Nebuloso, E., Renzi, L., and Giuliano, G.** (2001). Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ* **24**, 991-997.
- Phee, B.K., Park, S., Cho, J.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., and Hahn, T.R.** (2007). Comparative proteomic analysis of blue light signaling components in the Arabidopsis cryptochrome 1 mutant. *Mol Cells* **23**, 154-160.
- Pokorny, R., Klar, T., Essen, L.O., and Batschauer, A.** (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 935-938.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., and Essen, L.O.** (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 21023-21027.
- Popov, N., Schmitt, S., and Matthies, H.** (1975). Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biol Germ* **34**, 1441-1446.
- Poppe, C., Hangarter, R.P., Sharrock, R.A., Nagy, F., and Schafer, E.** (1996). The light-induced reduction of the gravitropic growth-orientation of seedlings of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. is a photomorphogenic response mediated synergistically by the far-red-absorbing forms of phytochromes A and B. *Planta* **199**, 511-514.
- Quail, P.H.** (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 180-188.
- Ramsey, A.J., Alderfer, J.L., and Jorns, M.S.** (1992). Energy transduction during catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* **31**, 7134-7142.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., and Chory, J.** (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* **5**, 147-157.

- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., and Chory, J.** (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol* **104**, 1139-1149.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R.** (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci* **76**, 3116-3120.
- Ritz, T., Adem, S., and Schulten, K.** (2000). A model of photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys J* **78** (2), 707-718.
- Ritz, T., Wiltschko, R., Hore, P.J., Rodgers, C.T., Stapput, K., Thalau, P., Timmel, C.R., and Wiltschko, W.** (2009). Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys J* **96**, 3451-3457.
- Rockwell, N.C., Su, Y.S., and Lagarias, J.C.** (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.
- Rosenfeldt, G., Viana, R.M., Mootz, H.D., von Arnim, A.G., and Batschauer, A.** (2008). Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation. *Mol Plant* **1**, 4-14.
- Rosler, J., Klein, I., and Zeidler, M.** (2007). Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10737-10742.
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev* **17**, 2642-2647.
- Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S., and Okada, K.** (2000). RPT2. A signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 225-236.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K.** (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6969-6974.
- Sakamoto, K., and Nagatani, A.** (1996). Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J* **10**, 859-868.
- Sakamoto, K., and Briggs, W.R.** (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**, 1723-1735.
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R.** (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sancar, A., and Sancar, G.B.** (1988). DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* **57**, 29-67.
- Sancar, A.** (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.
- Sancar, A.** (2008). Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem* **283**, 32153-32157.
- Sang, Y., Li, Q.H., Rubio, V., Zhang, Y.C., Mao, J., Deng, X.W., and Yang, H.Q.** (2005). N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell* **17**, 1569-1584.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., and Imaizumi, T.** (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* **318**, 261-265.
- Schafer, E., and Bowle, C.** (2002). Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep* **3**, 1042-1048.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., and Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Kolukisaoglu, Ü., Clapham, D.H., Hughes, J., and Lamparter, T.** (1998). Non-angiosperm phytochromes and the evolution of vascular plants *Physiol. Plant.* **102**, 612-622.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A.** (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2659-2670.



- Searle, I., and Coupland, G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* **23**, 1217-1222.
- Selby, C.P., and Sancar, A.** (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17696-17700.
- Senger, H.** (1984). Cryptochrome, some terminological thoughts. In *Blue Light Effects in Biological Systems*. Edited by Senger H: Springer Verlag, Berlin; 1984 **72**.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., and Chua, N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**, 995-999.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., and Lin, C.** (2002). Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* **417**, 763-767.
- Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., and Lin, C.** (2003). Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plant Cell* **15**, 2421-2429.
- Sharrock, R.A., and Quail, P.H.** (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**, 1745-1757.
- Sharrock, R.A., and Clack, T.** (2002). Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiol* **130**, 442-456.
- Sharrock, R.A., and Clack, T.** (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11500-11505.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I.S., Bae, G., Lee, C.H., Lee, D., and Choi, G.** (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7660-7665.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M.** (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8129-8133.
- Shinomura, T., Uchida, K., and Furuya, M.** (2000). Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**, 147-156.
- Shultz, R.W., Settlage, S.B., Hanley-Bowdoin, L., and Thompson, W.F.** (2005). A Trichloroacetic Acid-Acetone Method Greatly Reduces Infrared Autofluorescence of Protein Extracts from Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reports* **23**, 405-409.
- Small, G.D., Min, B., and Lefebvre, P.A.** (1995). Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Mol Biol* **28**, 443-454.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., and Kay, S.A.** (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* **282**, 1488-1490.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A.** (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell* **101**, 319-329.
- Somers, D.E., Kim, W.Y., and Geng, R.** (2004). The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* **16**, 769-782.
- Stacey, M.G., Kopp, O.R., Kim, T.H., and von Arnim, A.G.** (2000). Modular domain structure of Arabidopsis COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localization signal in planta. *Plant Physiol* **124**, 979-990.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A., and Kay, S.A.** (2000). Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**, 1116-1120.

- Subramanian, C., Kim, B.H., Lyssenko, N.N., Xu, X., Johnson, C.H., and von Arnim, A.G.** (2004). The Arabidopsis repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6798-6802.
- Sullivan, J.A., and Deng, X.W.** (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Dev Biol* **260** (2), 289-297.
- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M., and Deng, X.W.** (2002). Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev* **16**, 554-559.
- Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P.E., Eker, A.P., and Miki, K.** (1997). Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat Struct Biol* **4**, 887-891.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., and Quail, P.H.** (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9437-9442.
- Tepperman, J.M., Hwang, Y.S., and Quail, P.H.** (2006). phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant J* **48**, 728-742.
- Thompson, W.F., and White, M.J.** (1991). Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 423-466.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H.** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
- Torii, K.U., Stoop-Myer, C.D., Okamoto, H., Coleman, J.E., Matsui, M., and Deng, X.W.** (1999). The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically interacts with the RING-H2 motif of a novel Arabidopsis protein. *J Biol Chem* **274**, 27674-27681.
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., and Kozma-Bognar, L.** (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 1607-1616.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76**, 4350-4354.
- Tsuchida-Mayama, T., Sakai, T., Hanada, A., Uehara, Y., Asami, T., and Yamaguchi, S.** (2010). Role of the phytochrome and cryptochrome signaling pathways in hypocotyl phototropism. *Plant J* **62**, 653-662.
- Ueda, T., Kato, A., Kuramitsu, S., Terasawa, H., and Shimada, I.** (2005). Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem* **280**, 36237-36243.
- Usami, T., Matsushita, T., Oka, Y., Mochizuki, N., and Nagatani, A.** (2007). Roles for the N- and C-terminal domains of phytochrome B in interactions between phytochrome B and cryptochrome signaling cascades. *Plant Cell Physiol* **48**, 424-433.
- Valvekens, D., Montagu, M.V., and Lijsebettens, M.V.** (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5536-5540.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., and Coupland, G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006.
- Van Gelder, R.N.** (2003). Making (a) sense of non-visual ocular photoreception. *Trends Neurosci* **26**, 458-461.
- Vande Berg, B.J., and Sancar, G.B.** (1998). Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase. *J Biol Chem* **273**, 20276-20284.
- Vaughn, J.L.** (1973). Insect cell nutrition: emphasis on sterols and fatty acids. *In Vitro* **9**, 122-128.

- von Arnim, A.G., and Deng, X.W. (1994). Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* **79**, 1035-1045.
- von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F., and Deng, X.W. (1997). Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **114**, 779-788.
- Wang, Z.Y., and Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Deng, X.W. (2001). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* **294**, 154-158.
- Weber, S. (2005). Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta* **1707**, 1-23.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., and Harberd, N.P. (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**, 757-768.
- Whitelam, G.C., and Halliday, K.J. (2007). *Light and Plant Development*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.
- Wiltshko, W., and Wiltshko, R. (2006). Magnetoreception. *Bioessays* **28** (2), 157-168.
- Withrow, R.B., Klein, W.H., and Elstad, V. (1957). Action Spectra of Photomorphogenic Induction and Its Photoinactivation. *Plant Physiol* **32**, 453-462.
- Wu, G., and Spalding, E.P. (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18813-18818.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., and Nagatani, A. (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol* **145**, 437-445.
- Yamamoto, Y.Y., Matsui, M., Ang, L.H., and Deng, X.W. (1998). Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1083-1094.
- Yamamoto, K., Okano, T., and Fukada, Y. (2001). Chicken pineal Cry genes: light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts. *Neurosci Lett* **313**, 13-16.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A.R. (2000). The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* **103**, 815-827.
- Yang, H.Q., Tang, R.H., and Cashmore, A.R. (2001). The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* **13**, 2573-2587.
- Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W., and Wang, H. (2005). Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 804-821.
- Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., and Casal, J.J. (2000). A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol* **10**, 1013-1015.
- Yi, C., and Deng, X.W. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **15**, 618-625.
- Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., and Lin, C. (2007). Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* **19**, 3146-3156.
- Yu, X., Sayegh, R., Maymon, M., Warpeha, K., Klejnot, J., Yang, H., Huang, J., Lee, J., Kaufman, L., and Lin, C. (2009). Formation of nuclear bodies of Arabidopsis CRY2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *Plant Cell* **21**, 118-130.
- Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I., Young, J.C., Hangarter, R.P., and Meeks-Wagner, D.R. (1996). The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J* **10**, 691-702.

- Zeugner, A., Byrdin, M., Bouly, J.P., Bakrim, N., Giovani, B., Brettel, K., and Ahmad, M.** (2005). Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *J Biol Chem* **280**, 19437-19440.
- Zhang, X.N., Wu, Y., Tobias, J.W., Brunk, B.P., Deitzer, G.F., and Liu, D.** (2008). HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the Cryptochrome 1-mediated early response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **3(10)**, e3563.
- Zhu, Y.X., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D., and Quail, P.H.** (2000). Phytochrom B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13419-13424.

## Anhang A1

001	<sup>1 → COP1</sup> MEEISTDPVV PAVKPDPTS SVGEGANRHE NDDGSGSGSE IGAPDLDKDL	050
051	LCPICMQIIK DAFLTACGHS FCYMCIIITL RNKSDCPCCS QHLTNNQLYP	100
101	NFLLDKLLKK TSARHVSKTA SPLDQFREAL <sup>131 → CCOP1</sup> QRGCDVSIKE VDNLLTLAE	150
151	RKRKMEQEEA ERNMQILLDF LHCLRKQKVD ELNEVQTDLQ YIKEDINAVE	200
201	<sup>210 → HBG/BNG</sup> RHRIDLRYAR DRYSVKLRL GDDPSTRNAW PHEKNQIGFN SNSLSIRGGN	250
251	FVGNYQNKKV EGKAQGSSHG LPKDALSGS DSQSLNQSTV SMARKKRIHA	300
301	QFNDLQECYL QKRRQLADQP NSKQENDKSV VRREGYSNGL ADFQSVLTTF	350
351	TRYSLRVIA EIRHGDIFHS ANIVSSIEFD RDEL <sup>386 → HBK/BNK</sup> FATAG VSRCIKVDFD	400
401	SSVNEPADM QCPIVEMSTR SKLSCLSWNK HEKNHIASSD YEGIVTVWDV	450
451	TTRQSLMEYE EHEKRAWSVD FSRTEPSMLV SGSDCKVKV WCTRQEASVI	500
501	NIDMKANICC VKYNPGSSNY IAVGSADHHI HYYDLRNISQ PLHVFSGHKK	550
551	AVSYVKFLSN NELASASTDS TLRLWDVKDN LPVRTFRGHT NEKNFVGLTV	600
601	NSEYLACGSE TNEVYVYHKE ITRPVTSHRF GSPDMDDAEE EAGSYFISAV	650
651	CWKSDSPTML TANSQGTIKV LVLAA	675

**A1 A: Aminosäuresequenz (AS) von *Arabidopsis thaliana* (At) COP1 (constitutive photomorphogenetic 1).** AtCOP1 besitzt 675 Aminosäuren (hellgrau). Die Domänen *Ring-finger* (AS 45-94), *coiled-coil* (AS 128-209) und *WD-40 Repeat* (AS 386-619) sind dunkelgrau hinterlegt. Die einzelnen Konstrukte von COP1, die für die Expression in *E. coli* generiert wurden, sind mit der internen Bezeichnung sowie mit der jeweiligen ersten AS in rot dargestellt (Abb. nach McNellis *et al.*, 1994, 1996 und Torri *et al.*, 1996).

001	<sup>1 → CRY2</sup> MKMDKKTIVW FRRDLRIEDN PALAAAHEG SVFPVFIWCP EEEGQFYPPGR	050
051	ASRWWMKQSL AHLSQSLKAL GSDLTLIKTH NTISAILDCI RVTGATKVVF	100
101	NHLYDPVSLV RDHTVKEKLV ERGISVSSYN GDLLYEPWEI YCEKGKPFST	150
151	FNSYWKKCLD MSIESVMLPP PWRLMPITAA AEAIWACLIE ELGLENEAEK	200
201	PSNALLTRAW SPGWSNADKL LNEFIEKQLI DYAKNSKKVV GNSTSLSPY	250
251	LHFGEISVRH VFQCARMKQI IWARDKNSEG EESADLFLRG IGLREYSRYI	300
301	CFNFPFTHEQ SLLSHLRFFP WDADVDFKA WRQGRTGYPL VDAGMRELWA	350
351	TGWMHNRIRV IVSSFAVKFL LLPWKWGMKY FWDTLLDADL ECDILGWQYI	400
401	SGSIPDGHEL DRLDNPALQG AKYDPEGEYI RQWLPELARL PTEWIHHPWD	450
451	APLTVLKASG VELGTNYAKP IVDIDTAREL LAKAISRTRE AQIMIGAAPD	500
501	<sup>500 → CCT2</sup> EIVADSFEAL GANTIKEPGL CPSVSSNDQQ VPSAVRYNGS KRVKPEEEEE	550
550	RDMKKSFGFD ERELFTAES SSSSVFFVS QCSLASEGK NLEGIQDSSD	600
601	QITTSLGKNG CK	612

**A1 B: Aminosäuresequenz (AS) von *Arabidopsis thaliana* (At) CRY2 (Cryptochrome 2).** AtCRY2 besitzt 612 Aminosäuren. Die PHR Domäne (AS 1-500) ist hellgrau, die C-terminale Extension (AS 501-612) ist dunkelgrau hinterlegt. Das volllängen Konstrukt CRY2 sowie die kürzere Version CCT2 ist mit der ersten Aminosäure in rot dargestellt.

## Anhang A2 A

HBG	CCOP1	COP1	Konstrukt	Expressionsvektor		Affinitäts-Tag	Expressions <i>E. coli</i> Stämme								Temp.		Medium		Ergebnis
			pQE30	x											x				Anreicherung in Expressionskinetik; kein Signal in der Immunodelektion; keine Proteinaufreinigung
			pQE31																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			pQE60																Anreicherung in Expressionskinetik; Signal in der Immunodelektion
			pET28a(+)																Geringe Ausbeute in Proteinaufreinigung (0,768 µg/µl)
			pET51b(+)																Anreicherung in Expressionskinetik; kein Signal in der Immunodelektion; keine Proteinaufreinigung
			pACYC-Duet																Anreicherung in Expressionskinetik; kein Signal in der Immunodelektion; keine Proteinaufreinigung
			N-His-Tag																Anreicherung in Expressionskinetik; kein Signal in der Immunodelektion; keine Proteinaufreinigung
			C-His-Tag																Anreicherung in Expressionskinetik; Signal in der Immunodelektion
			C-Strep-Tag																Geringe Ausbeute in Proteinaufreinigung (0,58 µg/µl)
			M15 pREP-4																Anreicherung in Expressionskinetik; Signal in der Immunodelektion
			M15 pREP-4 pLys																Geringe Ausbeute in Proteinaufreinigung (1,34 µg/µl)
			BL21																Anreicherung in Expressionskinetik
			BL21(DE3)																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			BL21(DE3)-Ril																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			BL21(DE3)-Ril pLys																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			Origami (DE3)																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			Rosetta																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			30°C																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			37°C																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			LB																keine Anreicherung in Expressionskinetik
			TB																keine Anreicherung in Expressionskinetik

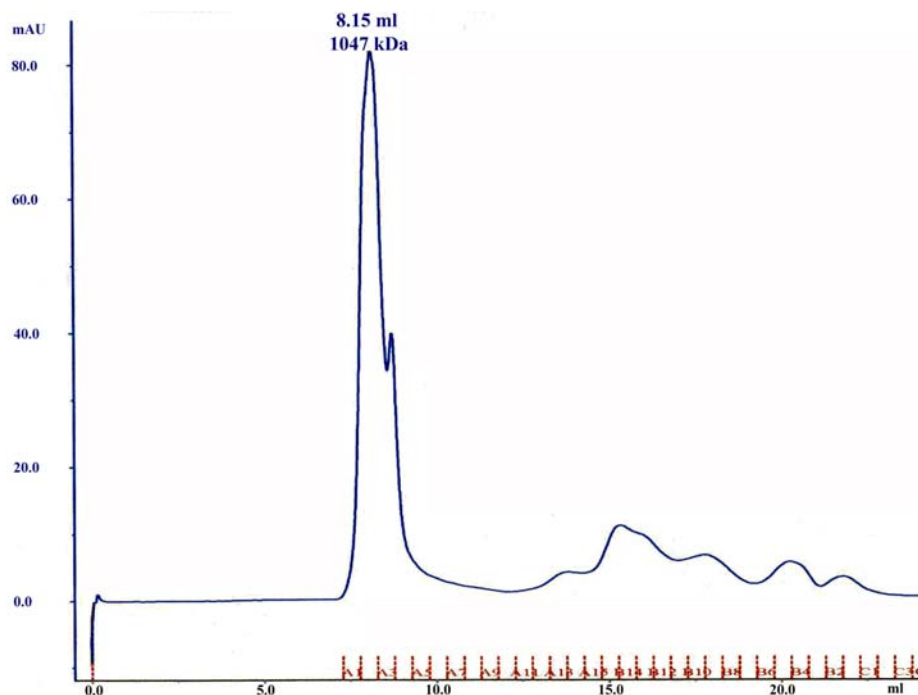
**Tabelle A2.A: Übersicht über die verschiedenen Versuche zur Expression der einzelnen generierten Konstrukte von COP1.** Angegeben sind die verschiedenen COP1 Konstrukte mit ihren internen Bezeichnungen, die Vektoren mit entsprechendem Affinitäts-Tag, die getesteten *E. coli* Stämme sowie getestete Medien und Temperaturen. Des Weiteren ist kurz das Ergebnis der einzelnen Versuche der Expression von verschiedenen COP1 Konstrukten angegeben.

## Anhang A2. B

Expressionsvektor		Affinitäts-Tag		Expressions <i>E. coli</i> Stämme							Temp.		Medium		Ergebnis											
Konstrukt			pQE30	pQE31	pQE60	pET28a(+)	pET51b(+)	pACYC-Duet	N-His-Tag	C-His-Tag	C-Strep-Tag	M15 pREP-4	M15 pREP-4 pLys	BL21	BL21(DE3)	BL21(DE3)-Ril	BL21(DE3)-Ril pLys	Origami (DE3)	Rosetta	30°C	37°C	LB	TB			
			x						x				x													
			x																							
			x																							
BNK																										
BNG																										
HBK																										
				</																						

**Tabelle A2.B: Übersicht über die verschiedenen Versuche zur Expression der einzelnen generierten Konstrukte von COP1.** Angegeben sind die verschiedenen COP1 Konstrukte mit ihren internen Bezeichnungen, die Vektoren mit entsprechendem Affinitäts-Tag, die getesteten *E. coli* Stämme sowie getestete Medien und Temperaturen. Des Weiteren ist kurz das Ergebnis der einzelnen Versuche der Expression von verschiedenen COP1 Konstrukten angegeben.

### Anhang 3



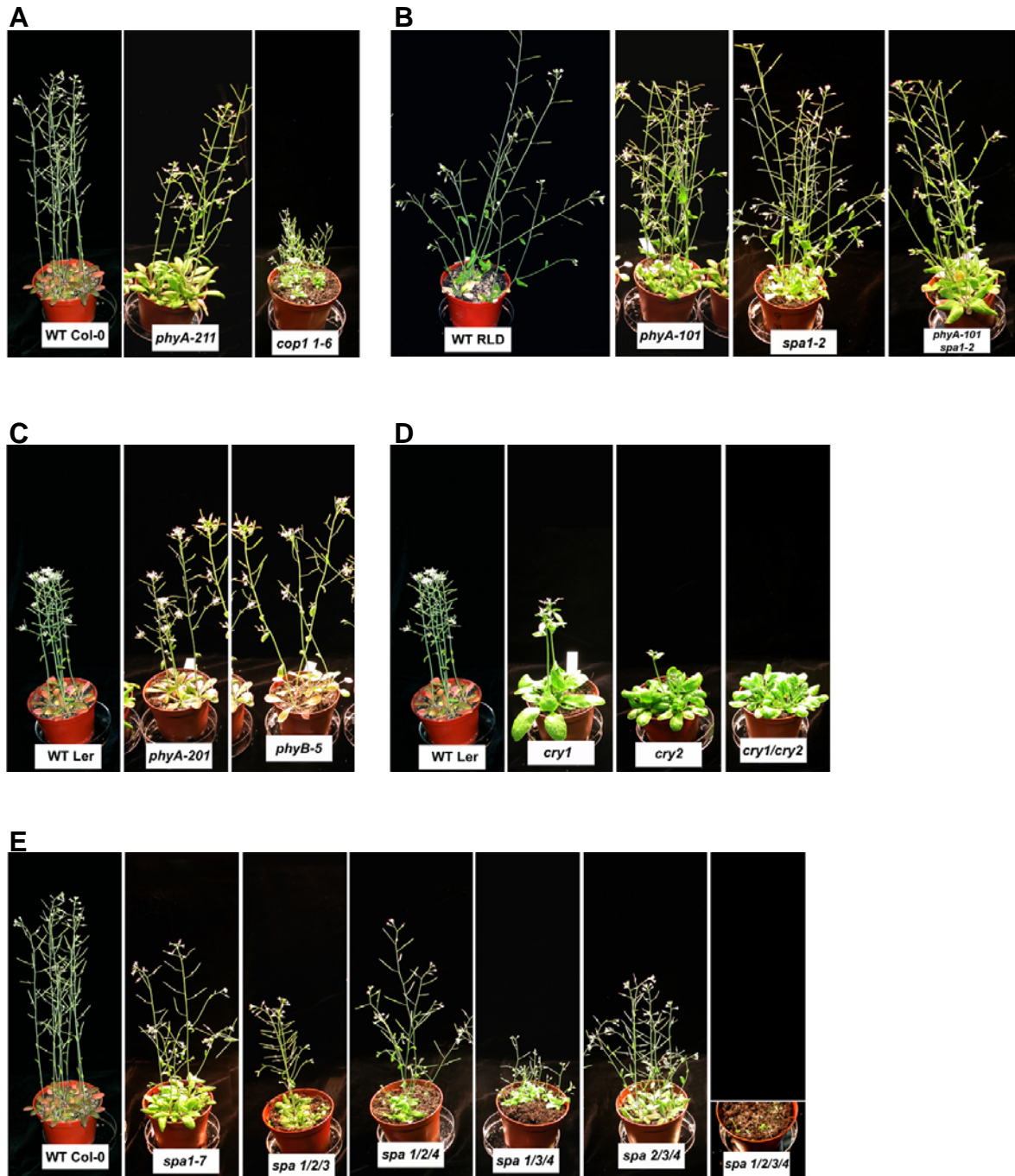
**A3: Gelausschlusschromatographie des aufkonzentrierten ( $c = [7,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$ ) rekombinanten Protein Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.** Chromatogramm der Auftrennung des aufgereinigten Proteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2. Die Detektion erfolgte über eine Absorption mittels einer Detektionswellenlänge von  $\lambda$  280 nm (blau). Das Protein Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 trennt sich in mehrere Peaks auf, wobei der Hauptanteil ein Elutionsvolumen von 8.15 ml hatte, was nach dem Abgleich mit den Standardproteinen einem Molekulargewicht von 1047 kDa entspricht und die fast vollständige oligomerisierung des rekombinanten Proteins Strep-FKBP<sub>(v)</sub>-CCT2 in Lösung verdeutlicht. Laufpuffer; Säulenvolumen sowie eingesetzte Proteinmenge siehe Material & Methoden 3.2.3.9.

	MW [kDa]	Elutionsvolumen [ml]	lg (MW)	Kav
Thyroglobulin	669,00	14,14	5,83	0,38
Ovalbumin	43,00	20,54	4,63	0,78
Chymotrypsinogen A	25,00	21,28	4,40	0,83
Ribonuclease	16,00	22,10	4,20	0,88
Aldolase	158,00	17,22	5,20	0,57
Albumin	67,00	18,65	4,83	0,66
Ferritin	440,00	15,20	5,64	0,44

**Tabelle A3: Übersicht über die eingesetzten Standard Proteine zur Eichung der Gelfiltrationssäule.** Angegeben sind die einzelnen verwendeten Proteine, ihr jeweiliges Molekulargewicht MW [kDa], das Elutionsvolumen [ml] sowie das Logarithmische Molekulargewicht lg (MW) und das zugänglich Volumen Kav.



## Anhang 4



**A4: Phänotypen verschiedener Ökotypen und Genotypen von adulten 32 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.** **A** Wildtyp Col-0 (*Columbia*) und die Einzelmutanten *phyA-211* und *cop1-6* im entsprechenden Hintergrund. **B** Wildtyp RLD (*Reschew*) und die Einzelmutanten *phyA-101* und *spa 1-2* sowie die Doppelmutante *phyA-101/spa1-2* im entsprechenden Hintergrund. **C** und **D** Wildtyp Ler (*Landsberg erecta*) und die Einzelmutanten *phyA-201*, *phyB-5*, *cry1*, *cry2* und die Doppelmutante *cry1/cry2* im entsprechenden Hintergrund. **E** Wildtyp Col-0 (*Columbia*) und die Einzelmutante *spa1-7* sowie die Dreifachmutanten *spa 1/2/3*, *spa 1/2/4*, *spa 1/3/4*, *spa 2/3/4* und die Vierfachmutante *spa 1/2/3/4*.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer bedanken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte, sowie für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung und Begleitung während meiner Promotion.

Frau Prof. Dr. Ute Hoecker danke ich für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten-Linien von *Arabidopsis thaliana*.  
Herrn Prof. Dr. Paul Galland danke ich für die Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen zu molekularbiologischen Arbeiten, für die Hilfe bei technischen Problemen, insbesondere was Computerprobleme und die Einführung in Computerprogramme betrifft, sowie für die entspannte Atmosphäre im Labor, für die gute Stimmung und das angenehme Arbeitsklima, für den Erfahrungsaustausch und die Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Agnes Damm, die mir eine große Hilfe in der Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Saatgut war. Des Weiteren möchte ich noch die Unterstützung von Elvira Happel hervorheben, auf deren Hilfe ich mich in Fragen der Klonierung und der Insekten Zell Expression immer verlassen konnte.

Für die Unterstützung bei dem experimentellen Teil meiner Arbeit, für gute Diskussionen und Ratschläge sowie dem Korrekturlesen meiner Arbeit gilt mein Dank Julia Moldt, Gesa Rosenfeldt und Christian Orth.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter Gabriele Weidler, die mir nicht nur das Studium ermöglicht hat sondern auch bei auftauchenden Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch möchte ich mich bei meinen Freunden Jonas, Katrin, Florian, Gero, Michi, Tobi, Lars, Melli und alle die ich vergesse habe zu erwähne für die schöne Zeit in Marburg bedanken sowie deren Unterstützung und gutes Zureden wenn es mal nicht so gut lief.

## Lebenslauf

Persönliche Daten	Familienstand	ledig
	Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung		Carl-Orff-Grundschule Hürth 07/1986- 06/1990
	Grundschule Gymnasium	Albert Schweitzer Gymnasium Hürth 07/1990-05/1999 Abschluss Abitur
Zivildienst		
Studium	Altenheim	Caritas-Seniorenzentrum Anna Haus, Hürth 08/1999-09/2000 Küche und freiwillige Pflege
	Studium an der Philipps Universität Marburg	10/2000-03/2001 Studium der Chemie 10/2001-03/2007 Studium der Biologie
Beruflicher Werdegang	Diplom-Biologe in	Pflanzenphysiologie/Photobiologie Genetik und Zellbiologie
	Diplomarbeit	<i>Heterologe Expression und Aufreinigung der Signaltransduktionsdomäne von Arabidopsis Cryptochrom 2 für in vitro Studien zur chemisch induzierbaren Dimerisierung und Interaktion mit COP1</i>
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter	05/2007- 2011 Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat. PhD Student in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Batschauer Schwerpunkt: Pflanzenphysiologie/ Photobiologie
Sonstiges		
Publikation	Fremdsprachen	Englisch in Wort und Schrift
	IT – Kenntnisse	Microsoft Office (Word/Excel/Power Point), Adobe Photoshop, Vector NTI/ Expasy Datenbank, Origin, Image J
	Weiterbildung	Scientific Writing in the Biological Science
	Konferenzen	Intra- and Intercellular Transport and Communication Symposium, 2007 Marburg
Publikation	Lehre	Betreuung von Diplom- und Bachelorarbeiten
	in Vorbereitung	<i>Degradation of Arabidopsis CRY2 is Regulated by SPA Proteins</i>

Marburg, 10.02.2011

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle der SPA-Proteine auf den lichtregulierten Abbau  
von Arabidopsis thaliana Cryptochrom 2“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch in keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Guido Benjamin Weidler)